

**INTRAZELLULÄRE WECHSELWIRKUNGEN
IM STOFFWECHSELWEG DER GLUCONEOGENESE
AUS LACTAT UND PYRUVAT**

Claudia Müller

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555625_0033

Aus dem
Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie
der Universität München

Direktoren: Prof. Dr.Dr.h.c. Th. Bücher, Prof. Dr. E.M. Klingenberg
und Prof. Dr. H.G. Zachau

INTRAZELLULÄRE WECHSELWIRKUNGEN

IM STOFFWECHSELWEG DER GLUCONEOGENESE AUS LACTAT UND PYRUVAT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Claudia Müller

aus
Sindelfingen

1977



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. G. Müllhofer

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Th. Bücher

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Juni 1977

I. EINLEITUNG

II. THEORETISCHE EINFÜHRUNG

A) Substrate der Gluconeogenese

B) Enzyme der Gluconeogenese

1. Phosphatasen in der Gluconeogenese

2. Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat

3. Weitere, mögliche Carboxylierungsreaktionen von Pyruvat

C) Stoffwechselmodell der Gluconeogenese

1. Weg des Glucoseaufbaus

2. Transport von C_4 -Kohlenstoffeinheiten und Redoxäquivalenten aus den Mitochondrien

3. Theoretische Stoffwechselmodelle der Gluconeogenese

III. METHODE UND MATERIALIEN

A) Die perfundierte Leber

1. Materialien

2. Perfusion

3. Produktionsraten und Konzentrationsbestimmung der Metabolite

4. Radioaktivitätsmessung

5. Isolierung der Metabolite

6. Bestimmung der Markierungsmuster der einzelnen Metabolite

B) Die Inkubation mit Leberzellen

1. Materialien

2. Präparation der Leberzellen

3. Inkubation der Leberzellen

IV. ERGEBNISSE

A) Die perfundierte Leber

1. Metabolitbewegungen im Medium

a) Experimente mit Lactat

b) Experimente mit Pyruvat

2. Spez. Aktivitäten der Metabolite

a) Experimente mit Lactat

b) Experimente mit Pyruvat

B) Die Inkubationen mit Leberzellen

1. Metabolitveränderungen im Medium

a) Inkubationen mit Lactat

b) Inkubationen mit Pyruvat

2. Spez. Aktivitäten der Metabolite

a) Inkubationen mit Lactat

b) Inkubationen mit Pyruvat

V. DISKUSSION

1. Markierungsmuster der Metabolite in den Experimenten an der perfundierten Leber bei Gabe von verschiedenen Tracern
2. Markierungsmuster der Metabolite in den Inkubationen der Leberzellen bei Gabe von verschiedenen Tracern

VI. LITERATURVERZEICHNIS

VII. ZUSAMMENFASSUNG

VIII. DANKSAGUNG

IX. LEBENSLAUF

I. E I N L E I T U N G

Die Frage nach dem Stoffwechselweg der Gluconeogenese im tierischen Organismus setzte erstmalig mit dem Einbau von ^{14}C -Atomen aus markierten Substraten ins Glykogen durch VENNESLAND und SOLOMON (1941) ein. Kurze Zeit später konnte HASTINGS (1942) mit $^{14}\text{CO}_2$ eine Aktivitätsanreicherung auch in der Glucose bestätigen. Durch Inkubation von Leberschnitten mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat, sowie ^{14}C -Bicarbonat entdeckte HASTINGS (1949) eine symmetrische Aktivitätsverteilung in den Stellungen 2 und 3 bzw. 5 und 6 der Glucose. Aus diesen Markierungsmustern der Glucose schloß er auf einen C_4 -Körper, der als notwendige Zwischenstufe der Glucosebildung durchlaufen werden sollte. Seiner Meinung nach konnte daher der Aufbau der Glucose mit einer Bindung von CO_2 an einen C_3 -Körper im Sinne einer WOOD-WERKMAN-Reaktion (1936) verbunden sein. Diese grundlegenden Experimente wurden anfangs an lebenden Tieren durchgeführt, denen die radioaktiven Substrate injiziert oder verfüttert wurden. Erst nach Entwicklung weiterer Methoden, wie z. B. der Gewebsschnitte und der Organperfusion, sowie Fortschritten in der Enzymanalyse, gelang es die einzelnen Zwischenstufen und Reaktionen der Gluconeogenese näher zu charakterisieren.

Trotz dieser Versuche von HASTINGS (1942, 1949) hatte man zunächst geglaubt, daß die Glucose über eine rückläufige Glycolyse neugebildet werden könne. Mehrere Reaktionsschritte der Glycolyse erwiesen sich jedoch aus thermodynamischen Gründen als irreversibel. Neben der Hexokinase und der Phosphofructokinase sollte auch die Pyruvatkinase in vivo nur als glycolytisches Enzym wirksam sein. Mit der Entdeckung der Pyruvatcarboxylase (UTTER 1960) und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (UTTER 1954) konnte man aber den Aufbau von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat ohne Beteiligung der Pyruvatkinase erklären. Da man außerdem spezifische Phosphatasen in der Zelle gereinigt hatte, mit denen sich die Phosphorylierungsreaktionen der Glycolyse umgehen ließen, galt der Weg der Gluconeogenese als weitgehend geklärt.

Mit der Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat durch die Pyruvatcarboxylase war auch die Bildung eines C_4 -Körpers als Intermediat der Gluconeogenese verständlich geworden. Da dieses Enzym fast ausschließlich in den Mitochondrien der Zelle nachgewiesen werden

konnte (UTTER 1963, BÖTTGER 1969), mußte man annehmen, daß sich der Oxalacetat-Pool der Gluconeogenese mit dem gleichen Intermediat-Pool des Citrat-Cyklus vermischen konnte. KREBS hatte bereits 1954 einen solchen gemeinsamen Oxalacetat-Pool für beide Stoffwechselwege gefordert. Der Einbau von ^{14}C -Atomen aus markierten Fettsäuren in die Glucose schien dies zu beweisen (BUCHANAN 1943, KREBS 1966).

In vielen Versuchen hatte diese Methode der radioaktiven Markierung gluconeogenetischer Substrate in der Zelle Aktivitätsmuster in den Intermediaten und der Glucose erbracht, die diesen Vorstellungen vom Stoffwechselweg der Gluconeogenese nicht widersprachen. KREBS (1966) hatte jedoch in seinen Versuchen an Nierenschnitten daraufhingewiesen, daß sich durch die Bestimmung solcher Markierungsmuster nur qualitative Aussagen über den Einbau von ^{14}C -Atomen in Intermediate der Gluconeogenese treffen lassen. Die tatsächlichen Reaktionsfolgen und Metabolitflüsse könnten damit nicht ausreichend aufgezeigt werden. VENEZIALE (1970, 1971) glaubte in seinen Experimenten mit 1-, 2- ^{14}C - und 3- ^{14}C -Pyruvat, sowie ^{14}C -Bicarbonat Hinweise zu entdecken, die auf unbekannte, intrazelluläre Zusammenhänge im Glucoseaufbau schließen ließen. Auch MÜLLHOFER (1972) konnte die Ergebnisse seiner Experimente mit 1- ^{14}C -Palmitat und 2- ^{14}C -Pyruvat an der perfundierten Rattenleber nicht mit dem beschriebenen Weg der Gluconeogenese in Einklang bringen.

In dieser Arbeit soll daher in Experimenten mit radioaktiv markierten Substraten der Gluconeogenese geprüft werden, ob die Aktivitätsmuster der isolierten Intermediate auch quantitativ den heutigen Vorstellungen von der Glucosebildung entsprechen und die geforderten intrazellulären Zusammenhänge und Metabolitflüsse wiedergeben. Dazu wurde die Gluconeogenese an der perfundierten Rattenleber und an isolierten Rattenleberzellen mit den radioaktiven Substraten 1- und 2- ^{14}C -Lactat bzw. -Pyruvat, ^{14}C -Bicarbonat und 1- ^{14}C -Octanoat untersucht. Die Aktivitätsmuster der gereinigten Intermediate werden mit theoretisch möglichen Markierungswerten dreier Stoffwechselmodelle verglichen, in denen die intrazellulären Zusammenhänge nach heutigen Kenntnissen beschrieben werden.

II. THEORETISCHE EINFÜHRUNG

A) SUBSTRATE DER GLUCONEOGENESE

Eine der wichtigsten Aufgaben der Glucose im Organismus liegt in der Bereitstellung von schnell verfügbarer Energie. Bestimmte Organe - zu ihnen zählt vor allem das gesamte Nervensystem - sind in ihrer Funktion von der Höhe der Glucosekonzentration im Blut abhängig. Zur Aufrechterhaltung eines optimalen Spiegels auch unter extremen Lebensbedingungen, wie z.B. Hunger, vermag daher der tierische Organismus in Leber und Niere Glucose neu zu bilden. Aminosäuren aus körpereigenem Eiweiß können dabei als Substrat dienen. CORI (1926) beschrieb, daß auch Lactat, das im Blut vor allem nach Muskelaktivität vermehrt anfällt, zur Gluconeogenese in der Leber verwendet wird. Im Experiment an der perfundierten Leber versucht EXTON (1967) die Glucoseproduktionsraten zu vergleichen, wenn verschiedene Substrate dem Perfusionsmedium zugesetzt werden. Mit Lactat, Pyruvat und Fructose läßt sich im Versuch eine höhere Glucosebildung erzielen als mit allen Aminosäuren.

B) ENZYME DER GLUCONEOGENESE

Neugebildete Glucose entsteht über eine teilweise Umkehrung der Glykolyse. Drei Reaktionsschritte des Glucoseabbaus hatten sich aus thermodynamischen Gründen als nahezu irreversibel erwiesen. Dazu zählten die Übertragung der Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat auf ADP durch die Pyruvatkinase (UTTER 1959), die Phosphofructokinase und Phosphorylierung der Glucose durch die Enzyme Glucokinase bzw. Hexokinase. Das Umkehren all dieser Zwischenschritte wird durch die dabei auftretende positive freie Energie (Pyruvatkinase: $G_0 = 7,5$ kcal; Phosphofructokinase: $G_0 = 3,4$ kcal; Hexokinase: $G_0 = 4,0$ kcal) erschwert (LEHNINGER 1971). Da unter gluconeogenetischen Bedingungen die Aktivität dieser Enzyme in der Zelle deutlich abfällt (SCRUTTON 1968), suchte man nach weiteren Reaktionsschritten, in denen vor allem die Glucosesynthese begünstigt wurde.

1. Phosphatasen in der Gluconeogenese

Zur Umgehung der beiden Phosphorylierungsschritte von Hexokinase und Phosphofructokinase fanden GOMORI und DOVE schon 1943 und 1949 zwei Enzyme in der Leber mit hohen Aktivitätsanstiegen unter gluconeogenetischen Bedingungen. Die Glucose-6-Phosphatase soll nach ASHMORE (1959) die Ausschleusung von neugebildeter, freier Glucose aus der Leberzelle ermöglichen. Dabei inhibieren ATP und P_i dieses Enzym, das, gebunden an das endoplasmatische Retikulum, mit einem K_m von 2 - 4 mM für Glucose-6-Phosphat und von 80 mM für Glucose nach NORDLIE (1972) fast ausschließlich als Phosphatase wirksam zu sein scheint. Ähnliches gilt für Fructose-1,6-di-Phosphatase (PONTREMOLI 1972), die ebenfalls vorwiegend aus gluconeogenetischem Gewebe isoliert wurde. Durch dieses Enzym erfolgt die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-di-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat, wobei AMP eine hemmende Funktion ausübt. Heute glaubt man, daß auch dieses Enzym vor allem an der Glucosebildung beteiligt ist und zusammen mit der Phosphofructokinase bei diesem Aufbau regulatorisch wirksam wird.

2. Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat

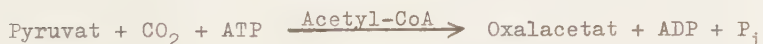
Als erste Aufbaustufe der Glucose mußte die Phosphorylierung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat umgangen werden. UTTER konnte 1954 aus der Hühnerleber ein Enzym isolieren, das folgende Reaktion katalysierte:



Diese Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase ließ sich in Leber und Niere vieler Tiere nachweisen, zeigte aber je nach Species verschiedene Lokalisation innerhalb der Zelle. In der Ratte fand sie sich ausschließlich im Cytoplasma in gelöster Form (NORDLIE 1963), während sie z.B. in der Schweineleber nur in den Mitochondrien bestimmt werden konnte. Anfänglich glaubte man, daß dieses Enzym durch Aufbau von Oxalacetat aus einem C-3-Körper eine wichtige anaplerotische Reaktion für den Citrat-Cyklus katalysierte. Weitere kinetische Studien (UTTER 1972)

ergaben jedoch hohe K_m -Werte für CO_2 ($K_m = 10 - 20 \text{ mM}$), so daß die physiologische Bedeutung dieses Enzyms als Carboxylase bezweifelt werden mußte. Tatsächlich ließ sich nachweisen, daß die Phosphoenolpyruvat-Bildung aus Oxalacetat 2 - 8 mal rascher erfolgt als die Fixation von CO_2 an den C_3 -Körper (Chang 1966). Da einige Autoren eine bis zu 6-fache Aktivitätssteigerung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase unter Hungerbedingungen, nach Applikation von Corticosteroiden und bei diabetischer Stoffwechsellage der Tiere aufzeigen konnten, suchte man nach ihrer Aufgabe in der Gluconeogenese (SHRAGO 1963, YOUNG 1964).

Die Umgehung der Pyruvatkinase-Reaktion über einen C_4 -Körper hatte sich in manchen Markierungsmustern der Glucose früherer Versuche (HASTINGS 1949) angedeutet. Dennoch war die Entstehung des geforderten C_4 -Körpers immer noch ungeklärt. Erst 1960 konnte UTTER mit der Isolierung eines weiteren Enzyms aus der Hühnerleber dieses Rätsel offensichtlich lösen. Bei seiner weiten Verbreitung im Tierreich wurden hohe Aktivitäten besonders in Leber, Niere und Fettgewebe nachgewiesen (UTTER 1963). Da dieses Enzym die Reaktion



$$G_0 = - 0,5 \text{ kcal}$$

katalysierte, wurde es als Pyruvat-Carboxylase bezeichnet. Im Gegensatz zur Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase ließ sich die Pyruvat-Carboxylase in der Rattenleber fast nur aus der Matrix der Mitochondrien reinigen (LAMARTINE, WEISS 1974; BÖTTGER 1969; SCRUTTON 1972). Die lösliche Form, die einige Autoren (RESHEF 1969; SEUBERT 1966; MARCO 1969) glaubten, entdeckt zu haben, wurde später als Verunreinigung erkannt (BALLARD 1970). Heute weiß man, daß dieses Enzym nur in Anwesenheit von Acetyl-CoA als Carboxylase aktiv wird (Mc CLURE 1971), und pro 1 μmol Enzym 4 μmol E-Biotin als Co-Enzym gebunden werden (SCRUTTON 1972).

Viele Autoren beschäftigten sich mit den Aufgaben dieses Enzyms im Stoffwechsel der Zelle.

KORNBERG (1966) betonte die anaplerotische Funktion für den Citrat-Cyklus, da die Pyruvat-Carboxylase die Auffüllung des Intermediat-Pools Oxalacetat katalysieren konnte. Auch in der Lipogenese spielt nach HANSON und BALLARD (1967) die Pyruvat-Carboxylase beim Transport von Acetyl-CoA aus den Mitochondrien ins Cytosol eine wichtige Rolle. UTTER (1965) jedoch sah die Schlüsselposition dieses Enzyms in der Gluconeogenese. Durch Fixation von CO_2 an Pyruvat sollte hier nach seiner Meinung der gesuchte, symmetrische C-4-Körper entstehen. Zusammen mit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase würde die Pyruvat-Carboxylase eine Reaktionsfolge katalysieren, die die thermodynamisch ungünstige Umkehrung der Pyruvatkinasereaktion zu umgehen hilft. Für beide Enzyme ließen sich in der Leber unter der Perfusion mit Lactat Aktivitätsanstiege nachweisen (Pyruvat-Carboxylase 60%; Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 20%) (WINHURST 1973). Grundsätzlich gilt für beide Enzyme, daß die katalysierten Reaktionsschritte reversibel sind. Wie bereits besprochen, wird dies für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wegen der physiologischen Substratkonzentrationen angezweifelt. Nach manchen Autoren soll dagegen die Pyruvat-Carboxylase zu etwa 10% der CO_2 -Fixation auch die Rückreaktion begünstigen (Mc CLURE 1971; SCRUTTON 1965). WILLIAMSON (1967) schreibt der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase in seinen Untersuchungen mit der "Crossing-Over"-Technik eine Schlüsselposition in der Regulation der Gluconeogenese zu, während HOBERMANN (1960) aus unterschiedlichen Markierungen der Glucose in Stellung 5 und 6 nach Lactatgabe Hinweise zu entdecken glaubte, daß Phosphoenolpyruvat auf mehreren Wegen geformt werden kann. Oxalacetat mußte nach seiner Meinung als Intermediat nicht unbedingt an der Glucosebildung beteiligt sein. Auch VENEZIALE (1970, 1971) zweifelte an der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase als gluconeogenetischem Enzym, als er in seinen Versuchen mit Pyruvat-2- ^{14}C die Aktivitäten von Malat und Phosphoglycerat bzw. Phosphoenolpyruvat verglich. Aus den Markierungsmustern schloß er auf eine Entstehung von Phosphoenolpyruvat ohne Beteiligung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase. MÜLLHOFER konnte in seinen Versuchen mit Pyruvat-2- ^{14}C diese Beobachtungen nicht bestätigen (1972). Auch die Aufgabe der Pyruvat-Carboxylase in der Gluconeogenese ist heute teilweise noch umstritten. Mehrfach wurden andere Carboxylasen untersucht, denen man zunächst Bedeutung in der Glucosebildung beimaß.

7. Weitere mögliche Carboxylierungsreaktionen von Pyruvat

UTTER schon 1963 sechs Carboxylierungsreaktionen zur Bildung eines C_4 -Körpers vor. Neben zwei Enzymreaktionen, die nur in Bakterien stattfinden, der Pyruvatcarboxylase- und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Reaktion zählte er auch das Malic-Enzym zu ihnen, das die Fixation von CO_2 an Pyruvat unter Verbrauch von NADPH zu Malat im Cytosol katalysiert. OCHOA hatte 1948 dieses Enzym in der Schweineleber entdeckt und seine Aufgaben wie KREBS (1954) zunächst in der Gluconeogenese gesehen (OCHOA 1950). Der Nachweis einer Aktivitätssteigerung dieses Enzyms unter Gabe einer Fructose- bzw. Glucosediät nach FETCH und CHAIKOFF (1962) ließ aber diese Behauptungen bezweifeln. Da gleichzeitig YOUNG (1964) hohe Konzentrationen dieses Enzyms nur im Fettgewebe bestimmen konnte, versuchte LARDY (1965) den Beweis zu erbringen, daß Malic-Enzym die NADPH-Bildung für die Lipogenese katalysiert. Heute weiß man, daß Malic-Enzym in der Rattenleber nur etwa ein Viertel der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität besitzt (KREBS 1970) und bei einem hohen K_m -Wert für CO_2 die Synthesereaktion eines C_4 -Körpers ein Drittel der Decarboxylierungsreaktion beträgt (ROGNSTADT 1972). Die Beteiligung an der Gluconeogenese im tierischen Organismus erscheint daher eher als unwahrscheinlich. Als letzte Carboxylierungsreaktion nannte UTTER die Bindung von CO_2 an Propionyl-CoA beim Abbau ungerader Fettsäuren. Da auch diese Reaktion auf die Glucosebildung keinen Einfluß hat, bleibt nur die Pyruvat-Carboxylase als gluconeogenetisches Enzym zur Bildung eines C_4 -Körpers aus Pyruvat übrig.

C) STOFFWECHSELMODELL DER GLUCONEOGENESE

1. Weg des Glucoseaufbaus

Für die meisten Autoren gilt heute, daß die Glucosebildung über einen symmetrischen C_4 -Körper führt. Bei der Fixation von CO_2 an Pyruvat durch die Pyruvat-Carboxylase soll Oxalacetat dabei im Mitochondrium der Rattenleber entstehen. Während Oxalacetat dort nie in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden konnte, nehmen die Metabolite Malat, Fumarat und Citrat nach

Substratgabe zu (WALTER 1966). Malat und Fumarat scheinen durch eine rasche Äquilibrierung der Malat-Dehydrogenase und der Fumarase mit Oxalacetat im Gleichgewicht zu stehen. Im Citrat-Cyclus entsteht Citrat durch Kopplung von Acetyl-CoA an Oxalacetat in der Citrat-Synthetase-Reaktion. Allgemein glaubt man daher heute, daß Citrat-Cyclus und Gluconeogenese an diesem Oxalacetat-Pool gemeinsam beteiligt sind, da eine Kompartimentierung der Pyruvat-Carboxylase nicht anzunehmen ist. Ob darüberhinaus andere Berührungspunkte mit weiteren Zwischenstufen des Citrat-Cyclus bestehen, hängt wahrscheinlich auch von den gluconeogenetischen Substraten ab. Unter den Bedingungen der Gluconeogenese aus Pyruvat muß ein erhöhter Umsatz von Oxalacetat im Citrat-Cyclus angenommen werden, da hier gleichzeitig die Redoxäquivalente entstehen können, die zum Aufbau der Glucose im Cytosol notwendig sind. Mit Lactat als Substrat ist eher eine direkte Umsetzung von Oxalacetat zu Glucose zu erwarten, das durch Carboxylierung von Pyruvat gebildet wird. Alle weiteren Synthesestufen der Glucose werden im Cytosol durch Umkehrung einzelner Glycolyseschritte und von den genannten gluconeogenetischen Enzymen, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Fructose-1,6-di-Phosphatase und Glucose-6-Phosphatase katalysiert.

2. Transport von C-4-Kohlenstoffeinheiten und Redoxäquivalenten aus den Mitochondrien

Damit der weitere Aufbau der Glucose über Oxalacetat in der Rattenleber stattfinden kann, muß ein C-4-Körper aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert werden. BORST (1963) und LARDY (1964) wiesen nach, daß die mitochondriale Membran für Oxalacetat nur sehr geringe Durchlässigkeit zeigt. Andere Intermediate des Citrat-Cyclus schienen dagegen diese Barriere leichter überwinden zu können. Nach Klingenberg (1970) lassen sich dafür drei unterschiedliche Transportsysteme an der inneren mitochondrialen Membran erkennen. Zu ihnen zählen ein Dicarbonsäure-Träger für Malat und Succinat, ein Tricarbonsäure-Träger für Citrat und Isocitrat und ein Transportprotein für -Ketoglutarat. Außerdem konnten besonders in den Mitochondrien der Leber und Niere vermehrt Trägereiweiße für Aminosäuren nachgewiesen werden.

Heute nimmt man an, daß bei der Gluconeogenese mit Pyruvat als Substrat Malat vermehrt aus den Mitochondrien austritt, und so neben dem Kohlenstoffgerüst die notwendigen Redoxäquivalente ins

- -

Cytosol gelangen. Durch die cytosolische Malat-Dehydrogenase kann Malat dann zu Oxalacetat regeneriert werden. In diesem Transportsystem soll Malat als Träger der H_2 -Äquivalente und C-Atome im Austausch mit Phosphat die mitochondriale Membran passieren. Bei Gabe von Lactat als gluconeogenetischem Substrat beschrieben LARDY und WALTER (1967) ein Zwei-Transaminasen-System, das den Transport von Aspartat aus den Mitochondrien ermöglichen sollte. Oxalacetat muß dabei in den Mitochondrien durch eine Glutamat-Oxalacetat-Transaminase zu Aspartat umgesetzt werden. Aspartat, das ins Cytosol gelangt, kann dort durch das entsprechende cytosolische Enzym wieder desaminiert werden. Zur Funktion der beiden genannten Transportsysteme muß gleichzeitig ein Austausch von Glutamat und α -Ketoglutarat über die mitochondriale Membran erfolgen. Während die Aufgabe von Trägerproteinen für Citrat in der Glucosebildung noch ungeklärt ist, gelten heute allgemein diese beiden genannten Transportsysteme als die wichtigsten Träger des Kohlenstoffgerüsts im Glucoseaufbau. Dennoch äußerte Müllhofer (1969) Zweifel an der Funktion dieses Glutamat-Aspartat-Austausches in der Gluconeogenese aus Lactat, als in seinen Versuchen mit $2-^{14}C$ -Lactat die Aspartatmarkierung deutlich unter der Aktivität im Malat lag. BERRY und KUN (1975) nahmen dagegen an, daß Aspartat und Malat bei der Gluconeogenese aus Lactat ins Cytosol transportiert werden und wiesen regulatorische Funktionen der Trägerproteine auf die Gluconeogeneserate nach. Die Frage des Transports von Kohlenstoffatomen und Redoxäquivalenten aus den Mitochondrien mit Hilfe von Aminosäuren und Intermediaten des Citrat-Cyklus muß daher weiterhin diskutiert und untersucht werden.

3. Theoretische Stoffwechselmodelle der Gluconeogenese

Mit diesen Kenntnissen über den Aufbauweg der Glucose sollten sich in dieser Arbeit unter konstanten Bedingungen theoretische Voraussagen über den ^{14}C -Einbau in Intermediate der Gluconeogenese im Fließgleichgewicht treffen lassen. Da die Glucosebildung in der Zelle in einem vielseitigen Zusammenhang mit anderen Stoffwechselwegen steht, kann sie immer nur in vereinfachten theoretischen Modellen erfaßt und verständlich gemacht werden. In solchen Modellen bestimmen die Metabolitflüsse zwischen verschiedenen Pools, die direkt oder indirekt am Glucoseaufbau beteiligt sind die Höhe der ^{14}C -Markierungen in den Intermediaten. Zur Berechnung der ^{14}C -Aktivitäten in den Intermediaten müssen diese Metabolitflüsse berücksichtigt werden. Gleichzeitig sollen für die Stoffwechselmodelle der Gluconeogenese in dieser Arbeit folgende Voraussetzungen entsprechend den bekannten Zellvorgängen gelten:

- a) Die beiden Stoffwechselwege Gluconeogenese und Citrat-Cyklus besitzen einen gemeinsamen Oxalacetat-Pool. Für die Glucosebildung aus Pyruvat muß auch ein gemeinsamer Malat-Pool gefordert werden.
- b) Es treten keine Zu- und Abflüsse in und aus Metabolit-Pools des Citrat-Cyklus mit Ausnahme der Reaktionen auf, die unmittelbar am Aufbau der Glucose aus Lactat und Pyruvat beteiligt sind.
- c) Die Synthese eines C-4-Körpers aus Pyruvat durch Fixation von CO_2 erfolgt nur in der Pyruvatcarboxylasereaktion.
- d) Die Reaktionen von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Pyruvatcarboxylase zur Synthese von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat gelten als irreversibel.

Unter diesen Bedingungen wird die Höhe des ^{14}C -Einbaus in Intermediate vor allem vom Verhalten des Umsatzes im Citrat-Cyklus zur Produktionsrate von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat bestimmt. Die Flußgeschwindigkeit im Citrat-Cyklus läßt sich dabei aus dem Sauerstoffverbrauch der Leber und ihren Verbrauchs- und Bildungsraten von Metaboliten im Medium abschätzen (WILLIAMSON 1969), während die Glucoseproduktion in Trioseeinheiten dem Umsatz von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat entspricht.

Ferner hat auch die Gleichgewichtseinstellung in den Reaktionen, die von Fumarase und Malatdehydrogenase im Cytosol und in den Mitochondrien katalysiert wird, Einfluß auf die Markierungsmuster

der Glucose und ihrer Vorstufen. Für die Glucosebildung aus Pyruvat zeigten die Experimente mit 2-¹⁴C-Pyruvat (MÜLLHOFER 1972), daß hier durch die Malat-Dehydrogenase nicht immer eine vollständige Äquilibrierung der Aktivitäten im Oxalacetat erreicht wird. In Versuchen mit ¹⁴C-Bicarbonat jedoch kann Markierung nur über eine Äquilibrierung der Fumarase und Malat-Dehydrogenase in die Glucose gelangen. In den Stoffwechselmodellen dieser Arbeit werden die Gleichgewichtseinstellungen dieser beiden Enzyme und die entsprechenden Metabolitflüsse nicht nach ihrer Kompartimentierung in Mitochondrien und Cytosol getrennt behandelt. Ebenso bleibt die Äquilibrierung der Metabolite über die mitochondriale Membran unberücksichtigt.

Folgende Übereinstimmungen in den Markierungsmustern werden aber vorausgesetzt: Die Kohlenstoffatome C1, C2 und C3 von Malat stimmen in ihrer rel. spez. Aktivität mit den Positionen C1, C2, C3 von Phosphoenolpyruvat, sowie mit den Stellungen C4 (C3), C5 (C2), C6 (C1) der Glucose überein. Die rel. spez. Aktivität der C-4-5-Einheit des Citrats wird der Markierung im Acetyl-CoA gleichgesetzt.

Im folgenden wird versucht, die geschilderten, komplexen intrazellulären Zusammenhänge als Modelle mit Hilfe von Blockdiagrammen (siehe Abb. 1 - 3) für Extrembedingungen darzustellen, um daraus je nach Tracer die Bereiche für die theoretisch möglichen rel. spez. Aktivitäten der Intermediate zu errechnen. Die wirksamen Metabolitflüsse werden dabei mit folgenden Buchstaben gekennzeichnet:

G Glucosebildungsrate in Trioseeinheiten ($G = G_1 + G_2$)

C Umsatzgeschwindigkeit im Citrat-Cyclus

D Umsatzgeschwindigkeit von Malat zu Fumarat

E Umsatzgeschwindigkeit von Pyruvat zu Acetyl-CoA

Die Kleinbuchstaben entsprechen den rel. spez. Aktivitäten je nach Stellung in den einzelnen Metaboliten.

Modell A :

Eine unbegrenzte Äquilibrierung zwischen den Metabolit-Pools Oxalacetat, Malat und Fumarat in Mitochondrien und Cytosol, sowie ein schneller Metabolitaustausch zwischen diesen beiden Zellkompartimenten wird vorausgesetzt. Diese Metabolitflüsse sollen die Umsatzrate im gluconeogenetischen Weg weit übertreffen.

I. Tracer : 1-¹⁴C-Lactat oder -Pyruvat, $H^{14}CO_3^-$ (Abb. 1)

$$G = 2 (G + C) x ; \quad x = G/2 (G + C)$$

II. Tracer : $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat oder -Pyruvat

$$\begin{aligned} 1.) \quad 2Cu &= 2 (G + C) x ; \\ 2.) \quad 2Cv + G &= 2 (G + C) y ; \\ 3.) \quad C (y + a) &= 2Cu ; \\ 4.) \quad 2Cv &= Cy ; \end{aligned}$$

$$y = G / (2G + C) ; \quad x = \frac{C (G / (2G + C) + a)}{2 (G + C)}$$

III. Tracer : $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fettsäuren

$$2 (G + C) x = C ; \quad x = C / 2 (G + C)$$

Modell B :

Zwischen den Metabolit-Pools Malat und Fumarat soll in diesem Modell nur eine limitierte Äquilibrierung stattfinden, während zwischen Oxalacetat und Malat eine uneingeschränkte Umsetzung erfolgen soll. Die cytosolische Fumaraseaktivität wird nicht berücksichtigt.

I. Tracer : $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat oder -Pyruvat (Abb. 2)

$$\begin{aligned} 1.) \quad (G + C + D) x &= (C + D) z + G ; \\ 2.) \quad 2 (C + D) z &= Dy + Dx ; \\ 3.) \quad (C + G + D) y &= (C + D) z ; \end{aligned}$$

$$x = \frac{G (2C + 2G + D)}{2 (C + G + D) (C + G)} ;$$

$$y = \frac{DG}{2 (C + G + D) (C + G)} ;$$

II. Tracer : $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$

$$\begin{aligned} 1.) \quad (G + C + D) x &= (C + D) z \\ 2.) \quad 2 (C + D) z &= Dy + Dx ; \\ 3.) \quad (C + G + D) y &= (C + D) z + G ; \end{aligned}$$

$$x = \frac{DG}{2 (C + G + D) (C + G)} ;$$

$$y = \frac{G (2C + 2G + D)}{2 (C + G + D) (C + G)} ;$$

III. Tracer : 2-¹⁴Lactat oder -Pyruvat

$$\begin{aligned}
 1.) & \quad 2 (G + C + D) y = 2 (C + D) r ; \\
 2.) & \quad 2 (C + D) r = 2Dy + 2Cu ; \\
 3.) & \quad G + (C + D) s = (G + C + D) x ; \\
 4.) & \quad (C + D) s = (G + C + D) z ; \\
 5.) & \quad 2Cu = Cz + Ca ; \\
 6.) & \quad 2Cv = Cx ; \\
 7.) & \quad 2 (C + D) s = 2Cv + Dx + Dz ;
 \end{aligned}$$

$$x = \frac{(2G + 2C + D) G}{(D + G + C) (2G + C)} ;$$

$$y = \frac{\frac{CG (C + D)}{2 (D + G + C) (2G + C)} + \frac{Ca}{2}}{(G + C)} ;$$

$$z = \frac{G (C + D)}{(D + G + C) (2G + C)} ;$$

IV. Tracer : 1-¹⁴C-Fettsäuren

Hierfür gelten die Gleichungen von Modell A, III.

Modell C :

Dieses Modell trifft nur für die Gluconeogenese aus Pyruvat zu, bei der Malat als C-4-Körper die mitochondriale Membran passieren soll. Der Malat-Pool im Mitochondrium soll unter diesen Bedingungen nicht mit dem Oxalacetat-Pool im gleichen Zellkompartiment äquilibriert sein. Malat kann demnach über den Citrat-Cyklus mit der Geschwindigkeit $G_1 + C$ und direkt aus Oxalacetat mit der Flußrate G_2 gebildet werden. Ferner soll keine Umsetzung direkt von Malat zu Fumarat im Cytosol und in den Mitochondrien erfolgen.

I. Tracer : 1-¹⁴C-Pyruvat

(Abb. 3)

$$\begin{aligned}
 1.) & \quad (G + C) y = G_2 x ; \\
 2.) & \quad (G + C) x = Cy + G ;
 \end{aligned}$$

$$x = \frac{(G + C) G}{(G + C)^2 - CG_2} ;$$

Abb. I :

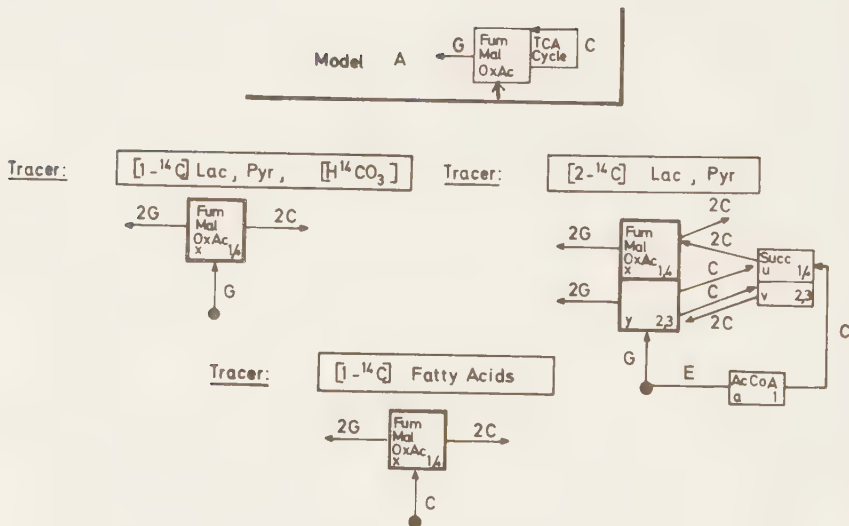
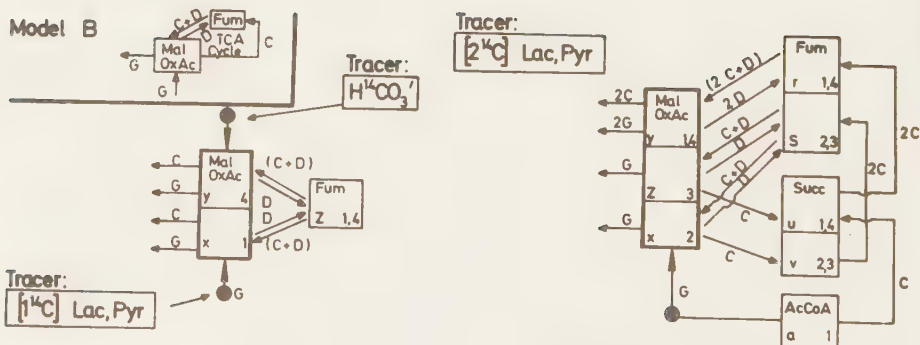


Abb. II :



$$y = \frac{GG_2}{(G + C)^2 - CG_2} ;$$

II. Tracer : $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fettsäuren

$$1.) \ 2 (C + G) y = C + G_1 + 2G_2x ;$$

$$2.) \ 2 (G + C) x = 2Cy ;$$

$$x = \frac{C (C + G_1)}{2 (G + C)^2 - G_2C} ;$$

$$y = \frac{(C + G_1) (C + G)}{2 (G + C)^2 - G_2C} ;$$

III. Tracer : $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$

Unter diesen Bedingungen wird Glucose nicht markiert.

IV. Tracer : $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat

$$1.) \ 2 (G + C) u = 2 (C + G_1) s + 2G_1z ;$$

$$2.) \ (G + C) v = (C + G_1) t + G_2y ;$$

$$3.) \ (G + C) w = (C + G_1) t + G_2x ;$$

$$4.) \ 2 (C + G) z = 2Cu ;$$

$$5.) \ (C + G) y = Cv ;$$

$$6.) \ (C + G) x = Cw + G ;$$

$$7.) \ 2 (C + G_1) s = (C + G_1) (y + a) ;$$

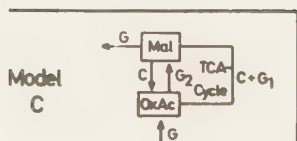
$$8.) \ 2 (C + G_1) t = (C + G_1) x ;$$

$$w = \frac{G (C + G + G_2)}{2 (G + C)^2 - C (C + G + G_2)} ;$$

$$v = \frac{(C + G_1) (Cw + G)}{2 (G + C)^2 - G_2C} ;$$

$$u = \frac{(C + G_1) (Cv + (C + G) a)}{2 ((G + C)^2 - G_1C)} ;$$

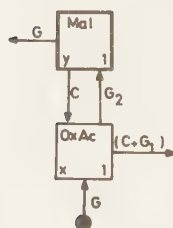
Abb. III



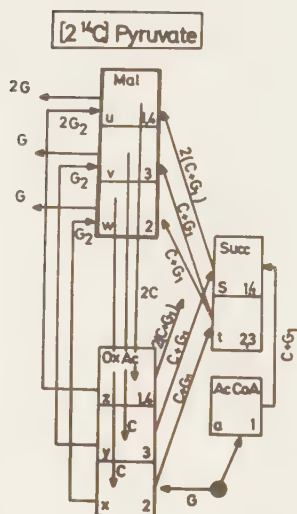
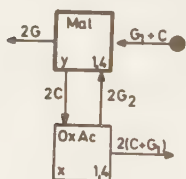
Tracer:

[1 ¹⁴C] Pyruvate

$$G = G_1 + G_2$$



[1 ¹⁴C] Fatty Acids



III. .. E T H O D E U N D M A T E R I A L I E N

A) DIE PERFUNDIERTE LEBER

1. Materialien

a) Tiere:

Für die Experimente wurden männliche Albinoratten vom Stamm Wistar FW 49 der Firma Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, verwendet. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 190 g und mußten vor Versuchsbeginn jeweils 24 Std. lang hungern.

b) Chemikalien, Enzyme und Substrate:

Als radioaktive Substrate wurden Pyruvat-1-¹⁴C, Pyruvat-2-¹⁴C, Bicarbonat-¹⁴C und Octanoat-1-¹⁴C vom Radiochemical Center, Amersham in England verwendet. Lactat-1-¹⁴C bzw. Lactat-U-¹⁴C wurde aus Pyruvat-1-¹⁴C bzw. Pyruvat-U-¹⁴C durch enzymatische Reduktion mit Lactatdehydrogenase und NADH hergestellt und säulenchromatographisch auf Dowex IX 8 Cl-Form gereinigt. Inaktives Na-Pyruvat und ebenso alle Enzyme stammten von der Fa. Boehringer GmbH, Mannheim. Na-Lactat lieferte die Fa. Roth OHG, Karlsruhe. Die zur Radioaktivitätsmessung verwendete Scintillationslösung bestand aus einem Gemisch von einem Teil Methanol und zwei Teilen Toluol, dem pro Liter 5 g 2,4-Diphenyloxazol (PPO) und 0,25 g 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl)-Benzol (POPOP) von der Fa. W. Zinsser, Frankfurt, zugesetzt wurden. Für die Säulenchromatographie wurden von der Fa. Serva, Heidelberg, Anionenaustauscher (Dowex IX 8, 200-400 mesh, Cl-Form) und Kationenaustauscher (Dowex 50 x 8, 200-400 mesh, H⁺-Form pract.) geliefert. Dowex IX 8 Acetat- und Formiat-Form wurden durch mehrmaliges Waschen der Cl-Form mit 3M Na-Formiat bzw. Na-Acetat hergestellt. Alle übrigen Chemikalien stammten von der Fa. Merck Ag, Darmstadt.

c) Perfusionsmedium:

In allen Experimenten wurde im hämoglobinfreien System mit Krebs-Henseleit-Bicarbonat Puffer (115 mM NaCl, 6,4 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1,2 mM Na₂SO₄, 2,5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃) perfundiert. Das Perfusionsmedium wurde im

Wasserbad auf eine Temperatur von 33°-37°C erwärmt und bei Wasserdampfsättigung von einem Filmoxygenator mit 95% O₂ und 5% CO₂ (vol/vol) äquilibriert. Dadurch wurde im Perfusionsmedium ein pH von 7,4 eingestellt.

2. Perfusion

a) Perfusionstechnik:

Die Ratten wurden in Nembutal-Narkose (Pentobarbital-Na, 5 mg / 100 g Körpergewicht) nach Heparinisierung mit 0,1 ml Liquemin i.v. operiert. Dazu wurde die Präparationsmethode nach SCHOLZ (1968) angewandt, wobei der Übergang von natürlicher zu künstlicher Durchströmung der Leber durch Einführung von Perfusionskanülen in die Pfortader und in die Vena cava inf. bei strömendem Perfusionsmedium ohne Unterbrechung der Zirkulation erreicht wurde. Das Perfusionsmedium wurde über diskontinuierlich arbeitende Rollenpumpen von und zur Leber transportiert. Damit eine gleichmäßige Durchströmung aller Leberläppchen gewährleistet war, wurde im abführenden Schenkel des Perfusionssystems der Druck erhöht, indem die Leber nach SCHOLZ in der Perfusionsapparatur aufgehängt wurde. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug im Mittel 32 ml/min.

b) Perfusionsverlauf:

Die Perfusionsdauer betrug 30 min. Die Leber wurde dabei 10 min lang im rezirkulierenden System, anschließend 10 min lang im offenen System substratfrei durchströmt, um die endogenen Kohlenhydratspeicher im Gewebe zu entleeren. Daran schloß sich eine 10 minütige Perfusion im offenen System mit aktivem Substrat an, wobei 5 mM Pyruvat bzw. Lactat dem Medium zugesetzt wurde. Die Perfusion wurde mit einem Gefrierstop der Leber bei noch laufenden Pumpen beendet. Dazu wurde eine in flüssigem Stickstoff vorgekühlte Aluminiumzange verwendet. Diese wurden bis zur Weiterverarbeitung im flüssigen Stickstoff gekühlt gehalten.

c) Venöses Perfusat:

Um die Produktionsraten der Leber bei der Perfusion messen zu können, wurden auf der venösen Seite im Abstand von jeweils 1 Minute dem Medium mehrere Proben entnommen. Zum Vergleich der Stoffwechselaktivität der Leber vor und nach Substratgabe wurde damit bereits 2 min vor Umschalten auf das

Perfusionsmedium mit Substrat begonnen. Wir pipettierten jeweils 1 ml in 0,2 ml 2 M Perchlorsäure und stoppten damit in der Probe sofort alle enzymatischen Reaktionen. Als Nullwerte wurden drei entsprechende Proben auf der arteriellen Seite der Leber dem Medium entnommen. Eine Minute vor Beendigung der Perfusion wurde das gesamte venöse Perfusat in einem Gefäß gesammelt, das 5 ml 2 M Perchlorsäure enthielt. Diese Sammelprobe diente zur Bestimmung der spez. Aktivität von Glucose und anderer Metabolite.

d) Extraktbereitung:

Die Leberstanzen (siehe 2,b) wurden in einem Porzellanmörser bei -25°C zerkleinert. Jeweils 2g Portionen wurden in 10 ml einer Lösung von 6% Perchlorsäure und 40% Äthanol (1 : 10) aufgenommen. Unter Eiskühlung wurde die Leber im Gewebshomogenisator (Ultra-Turrax Typ 18/2, 200 Upm, Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen i. Br.) 2 x 10 sek lang weiter aufgeschlossen. Anschließend wurde die Leber wiederum 2 x 10 sek lang mit Ultraschall (Branson Sonifier, Modell LS-75, 20 kHz, Branson Instr. USA) behandelt, um alle zellulären Membranen aufzubrechen. Nach Zentrifugation bei 17 000 x g für 10 min in der Ultrazentrifuge (Sorvall RC2-B, Sorvall Inc. USA) setzten sich die Membranen und nicht aufgeschlossenen Bestandteile der Leber ab. Der Überstand wurde mit 6 N Kalilauge auf pH 7 eingestellt und das ausfallende KMnO_4 abzentrifugiert. Die durchschnittliche Extraktmenge betrug 40 ml. Darin ließen sich die Metabolitspiegel direkt mit Hilfe optischer Teste bestimmen. Im Gefriertrocknungsapparat (WKF, Modell L 05-70⁰, Ges. f. Elektrophysik. Apparatebau, Brandau/Odw.) wurde das Extraktvolumen eingeengt und die gefriergetrockneten Bestandteile erneut in 5 - 6 ml H_2O aufgenommen. Noch vorhandene Membranen konnten durch weitere Zentrifugation bei 12 000 x g in 10 min entfernt werden.

3. Produktionsraten und Konzentrationsbestimmung der Metabolite

In den venösen Perfusatproben (siehe 2,c) wurden nach Neutralisation mit 0,18 ml Kaliumcarbonat in Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (jeweils 1,6 M) die Konzentrationen folgender Stoffwechselprodukte bestimmt : Glucose, Lactat, Pyruvat, Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat. Ebenso wie bei allen anderen Konzentrationsbestimmungen von Metaboliten im

Extrakt und Perfusat wurden dabei die einschlägigen Methoden nach dem optischen Test benutzt (BERGMAYER 1963).

4. Radioaktivitätsmessung

Die Trennung der einzelnen, markierten Metabolite erfolgte an Säulen chromatographisch. Der Durchlauf wurde zu Aliquots von je 3,5 - 4 ml in Sammelgefäßen wieder aufgefangen. Zur Lokalisation der Metabolite in diesem Eluat wurde ein Durchflußzähler (Tri Carb Flow Analyser, Modell 3021, Packard Instr. Comp. USA) verwendet, der durch direktes Aufzeichnen der Aktivitätsanstiege die entsprechenden Sammelgefäße kennzeichnete. Alle übrigen Radioaktivitätsmessungen zur Lokalisation von Perfusat- oder Extraktmetaboliten in den Sammelgefäßen oder zur Bestimmung ihrer spez. Aktivität erfolgten im Flüssigkeitsszintillationszähler (Modell 3003 bzw. 2425, Packard Instr. Comp. USA). Die Zählung wurde in der bereits beschriebenen Lösung (siehe 1,b) durchgeführt.

5. Isolierung der Metabolite

a) Venöse Sammelprobe:

Im Perfusat (siehe 2,c) wurden die Metabolite Glucose, Pyruvat, Lactat, Acetoacetat und -Hydroxybutyrat gereinigt. Dazu mußten zunächst die Kationen auf einer Säule mit Dowex-50 H^+ adsorbiert werden. Der Durchlauf enthält die Metabolite Glucose, Lactat, Acetoacetat und -Hydroxybutyrat, die auf einer weiteren Säule mit Dowex-Acetat chromatographisch getrennt wurden. Als Elutionsmedium wurde ein linearer Gradient von 200 ml H_2O / 200 ml 0,7 N Essigsäure verwendet. Glucose wurde von der Dowex-Acetat-Säule eluiert, ohne adsorbiert worden zu sein. Nach Auffangen des Durchflusses und Reduzierung des Volumens am Rotationsverdampfer (Rotavapor R. Fa. Büchi, Schweiz) wurde die Glucose enzymatisch mit Hexokinase, Phosphofructokinase, Creatinkinase, Creatinphosphat und ATP in katalytischen Mengen zu Fructose-1,6-di-Phosphat umgesetzt. Die Reinigung von FDP fand auf einer Dowex-IX8-Cl-Säule durch Elution mit einem linearen Gradienten (250 ml H_2O / 250 ml 0,2 N HCl) statt.

Die Eluate von Lactat und β -HOB wurden ebenfalls gesammelt, wegen der Flüchtigkeit dieser Substanzen mit kleinen Mengen KHCO_3 versetzt und im Rotationsverdampfer zur Trockenen evaporiert. Nach Radioaktivitätsmessung und Konzentrationsbestimmung ließen sich für diese Metabolite die spez. Aktivitäten errechnen.

b) Metabolite im Extrakt:

Aus dem Leberextrakt (siehe 2,d) wurden durch Anionenaustauschchromatographie auf einer Dowex-Formiat-Säule (100 x 1 cm) die einzelnen Metabolite getrennt. Mit Hilfe eines exponentiellen Gradienten (120 ml H_2O / 120 ml H_2O / 120 ml 1 N Ameisensäure) ließen sich mehrere radioaktive Metabolite (siehe 4.) isolieren. Die auf der Säule stärker haftenden Substanzen wurden mit dem anschließenden, exponentiellen Gradienten höherer Konzentrationen (120 ml 1 N / 120 ml 1 N / 120 ml 6 N Ameisensäure) und einem darauffolgenden linearen Gradienten (120 ml 6 N Formiatsäure / 120 ml 2 N Na-Formiat) eluiert. Die einzelnen, gereinigten Metabolite wurden aus den Sammelgefäßen aufgenommen, im Rotationsverdampfer evaporiert und in kleinerem Volumen erneut gelöst. Darnach erfolgte die Konzentrationsmessung und Radioaktivitätsbestimmung. Metabolite, die mit Na-Formiat eluiert worden waren, mußten vor der weiteren Analyse über eine Säule mit Dowex-50 H^+ gegeben werden, um alle die Teste störenden Ionen zu entfernen.

Hier ein Beispiel eines Chromatogramms (Abb. IV):

Peak I : Glucose und alle übrigen apolaren Substanzen;
Glucose wurde zu FDP umgesetzt (siehe 5,a) und
erneut auf Dowex-Cl gereinigt.

Peak II : Glutamat in reiner Form.

Peak III : Aspartat, das durch Rechromatographie auf Dowex-50 H^+
von Carbonsäuren gereinigt wurde.

Peak IV : Lactat, das nach Rechromatographie über Dowex-Acetat
in reiner Form gewonnen wurde.

Peak VI : Succinat in reiner Form.

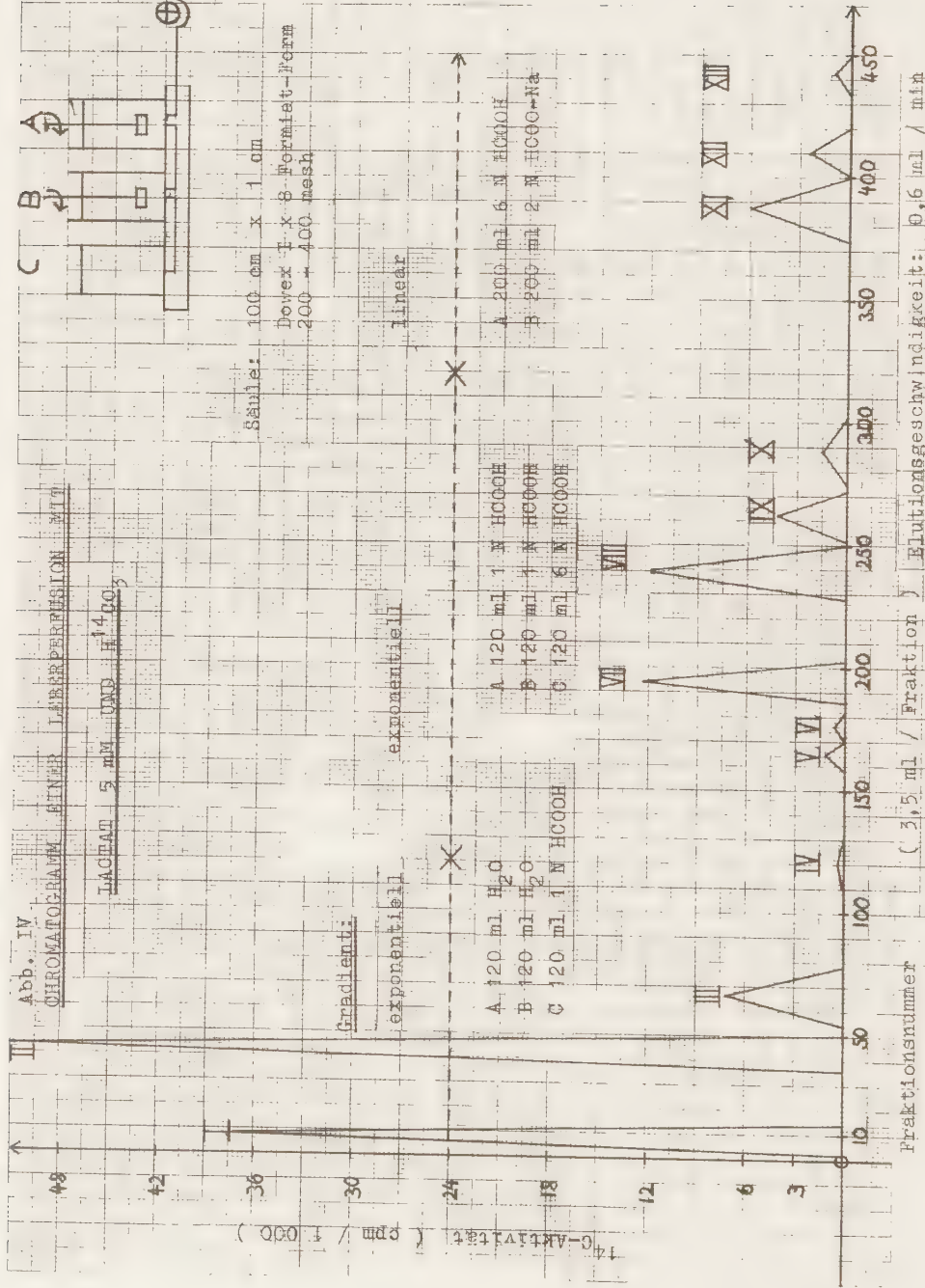
Peak VII : Malat in reiner Form.

Peak VIII: Citrat und Pyruvat eluierten gleichzeitig.

Pyruvat wurde enzymatisch mit Lactatdehydrogenase
und NADH bei pH 7 zu Lactat umgesetzt und auf
Dowex-Formiat mit 120 ml H_2O / 120 ml H_2O / 120 ml
6 N Formiatsäure im Dreikammergradientengemisch

Abb. IV
CHROMATOGRAMM EINER LÄUTPERMISSION MIT

LACTAT 5 mM UND H⁺ 4 CO₂



von Citrat abgetrennt.

Citrat wurde auf Papier (Papier Whatman 3 mm) aufgetragen und nach Elution mit einer Lösung aus 6 N Ameisensäure und n-Amylalkohol (1 vol / 1 vol) chromatographisch absteigend in einer Kammer gereinigt. Um die spätere Lokalisation zu erleichtern, wurde nicht-markiertes Citrat gleichzeitig parallel aufgetragen. Nach 14-stündiger Chromatographie konnte das inaktive Citrat mit einem Sprühreagenz (pH-Indikator Bromkresolgrün, 0,04% in Isopropanol mit NaOH auf pH 7 eingestellt) lokalisiert werden. Da angenommen werden konnte, daß das markierte Citrat den gleichen Abstand zum Start erreicht hatte, wurde es dort mit H_2O eluiert. Als Kontrolle diente ein Dünnschicht-Scanner (Fa. Berthold).

Peak IX : α -Glycerophosphat war verunreinigt mit Zuckerphosphaten und mußte daher zunächst mit Mg^{2+} im Acetatpuffer bei pH 5,5 mit saurer Phosphatase zu Glycerin dephosphoriliert werden. Nach Rechromatographie und Reinigung auf Dowex-Cl-Form mit linearem Gradienten 250 ml H_2O / 250 ml 0,1 N HCl konnte Glycerin mit ATP bei neutralem pH und unter Katalyse von Mg^{2+} -Ionen mit Glycerokinase spezifisch zu α -Glycerophosphat rephosphoriliert werden. Es erfolgte eine abschließende Chromatographie auf Dowex-Cl-Form (linearer Gradient 250 ml H_2O / 250 ml 0,1 N HCl).

Peak X : α -Ketoglutarat, das bei neutralem pH mit Glutamatdehydrogenase, NADH und NH_4Cl zu Glutamat umgesetzt wurde. Glutamat wurde abschließend auf Dowex-Acetat gereinigt.

Peak XI : Phosphoglycerinsäure, die wegen Verunreinigungen mit Phosphoglyceratmutase, Enolase, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase, mit den Co-Enzymen ADP und NADH, mit 2,3-di-PGS in katalytischen Mengen, mit Mg^{2+} - und K^+ -Ionen bei neutralem pH zu Lactat umgesetzt wurde. Die abschließende Reinigung erfolgte auf Dowex-Formiat mit linearem Gradienten (250 ml H_2O / 250 ml 6 N Ameisensäure).

Peak XIII: Phosphoenolpyruvat, das mit Pyruvatkinase, Lactatdehydrogenase, Mg^{2+} - und K^{+} -Ionen, mit NADH und ADP zu Lactat umgesetzt und auf Dowex-Acetat (siehe 5,a) gereinigt wurde.

Die Metabolite von Peak V und Peak XII konnten nicht identifiziert werden, obwohl sie regelmäßig in den Chromatogrammen zu sehen waren. Ihre Rolle in der Gluconeogenese blieb unbekannt.

6. Bestimmung der Markierungsmuster der einzelnen Metabolite

a) Glucose:

Die Glucose wurde zu FDP umgesetzt und gereinigt (siehe 5,a). Der weitere Abbau der Glucose zur Bestimmung der spez. Aktivität in den Positionen 4,5 und 6 erfolgte durch Inkubation von FDP bei pH 7 mit Aldolase (frei von Triosephosphat-Isomerase) zu Dihydroxyaceton-3-P und Glycerinaldehyd-3-P. Glycerinaldehyd-3-P wurde mit Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase und dem Co-Enzym NAD unter Zusatz des Schutzpeptids Glutathion und Arsenat als Katalysatoren zu Phosphoglycerat umgesetzt. Die Trennung der beiden Metabolite Dihydroxyaceton-3-P und Phosphoglycerat erfolgte auf einer Dowex-Cl-Säule (Elution mit linearem Gradienten 200 ml H_2O / 200 ml 0,1 N HCl). Nach dieser Reinigung wurde auch Dihydroxyaceton-3-P zu Phosphoglycerat enzymatisch umgesetzt. Der weitere Umsatz von Phosphoglycerat führte zur Bestimmung der spez. Aktivität in den Stellungen 4, 5 bzw. 2, 3 der Glucose. Im Acetatpuffer bei pH 5,5 wurde dazu 3-PGS mit Hilfe der sauren Phosphatase dephosphoryliert. Das dabei entstandene Glycerat wurde auf Dowex-Acetat adsorbiert, mit 4 N Essigsäure eluiert und erneut umgesetzt. Perjodsäure spaltete Glycerat bei saurem pH zu Glyoxylat und CO_2 . Nach Reinigung von Glyoxylat auf Dowex-Acetat ließ sich seine spez. Aktivität bestimmen und mit der Markierung in Stellung 4,5 bzw. 2,3 der Glucose gleichsetzen. Als letzten Abbauschritt inkubierten wir Glyoxylat bei pH 7 mit H_2O_2 und erhielten Formiat und CO_2 , das mit Trockeneis ausgetrieben wurde. Die Restaktivität im Rückstand ließ auf die spez. Aktivität der Stellung 5 bzw. 2 der Glucose schließen.

Tab. I : Markierungsbestimmung in den einzelnen Positionen der Glucose durch Messung der spez. Aktivitäten von Derivaten.

<u>Produkt:</u>	<u>Positionsmarkierung:</u>
Glucose	1,2,3,4,5,6
FDP	1,2,3,4,5,6
DAP	1,2,3
3-PGS	4,5,6
Glyoxylat	2,3 bzw. 4,5
Formiat	5 bzw. 2
Acetaldehyd	5,6 bzw. 1,2

b) Lactat:

Zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität in der Carboxylgruppe des Lactats spalteten wir es mit KMnO_4 zu CO_2 und Acetat. Mit Cer II - Sulfat inkubiertes Acetat ergab CO_2 und Acetaldehyd. Aus der Differenz der eingesetzten und erneut nach Umsetzung gemessenen Aktivität vor und nach Austreibung von CO_2 konnte die spez. Aktivität in allen drei Positionen des Lactats errechnet werden.

c) Citrat:

Citrat wurde aus Peak VIII gereinigt (siehe 5,b) und seine spez. Aktivität bestimmt. Um weiteren Aufschluß über die Markierung seiner C-4-C-5 bzw. C-1-C-2-C-3-C-6- Gruppe zu erhalten, wurde es mit Hilfe von Citratlyase bei pH 7 unter Zugabe von Zn-Ionen zu Acetat und Oxalacetat gespalten. Oxalacetat decarboxylierte teilweise spontan zu Pyruvat, da die Citratlyase mit einer Oxalacetat-Decarboxylase verunreinigt war. Pyruvat wurde mit NADH und Lactatdehydrogenase zum stabilen Lactat umgesetzt. Das übrige Oxalacetat konnte mit NADH und Malatdehydrogenase zu Malat reduziert werden. Die drei Reaktionsprodukte, Acetat, Malat und Lactat wurden nach Ansäuern der Inkubation in ein Lyophilisationsgefäß mit zwei Schenkeln gegeben. Acetat lyophilisierte dort vom ursprünglichen Schenkel in den zweiten hinüber. Malat und Lactat blieben zurück. Nach Neutralisation konnten Malat und Lactat

auf einer Dowex-Formiat-Säule mit 200 ml H_2O / 200 ml H_2O / 200 ml 6 N Ameisensäure getrennt eluiert werden. Acetat wurde hingegen mit ATP, Mg^{2+} -Ionen, mit dem Co-Enzym CoA, NAD^+ , Malat als Kopplungssubstanz, durch die Enzyme Malatdehydrogenase und Acetyl-CoA-Synthetase zu Citrat umgesetzt. Die Reinigung erfolgte wieder auf einer Dowex-Formiat-Säule. Daran schloß sich die jeweilige Bestimmung der spez. Aktivität an, wobei die Markierung im Citrat aus Acetat der spez. Aktivität in der C-4-C-5- Gruppe, Malat und Lactat aber in ihrer Aktivität den Positionen 1,2,3,6 bzw. 1,2,3 des ursprünglichen Citrats entsprachen.

B) DIE INKUBATIONEN MIT LEBERZELLEN

1. Materialien

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Substrate, ebenso die Versuchstiere wurden bereits für die Experimente mit der perfundierten Leber beschrieben. Im Unterschied zu den Perfusionsversuchen wurde jedoch als Medium eine Ca-freie Lösung verwendet, die aber in den übrigen Ionenkonzentrationen mit dem Medium der Perfusion übereinstimmte.

2. Präparation der Leberzellen

Zur Präparation der Leberzellen wurde die gleiche Operationstechnik wie bei den Perfusionsexperimenten angewandt. Nach Freilegung der Leber wurde zunächst 20 min lang im offenen System mit Ca-freier Lösung perfundiert, um die restlichen Kohlenhydratspeicher zu erschöpfen. Für die eigentliche Leberzellpräparation nach BERRY (1969) erfolgte darnach eine 10-minütige Perfusion mit Kollagenase (60 mg / 100 ml) im geschlossenen System. Dieses Enzym daute das Stützgewebe der Leber an, so daß Flüssigkeit an der Oberfläche der Leber austrat. War daher kein venöser Abfluß mehr möglich, galt die Perfusion als beendet. Dies konnte immer nach etwa 10 Minuten beobachtet werden.

Darnach wurden die einzelnen Zellen in einer Schale, die mit Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer angefüllt war, mit Hilfe eines Kunststoffspatels vom restlichen, noch unverdauten Bindegewebsgerüst abgestreift. Etwa 70% der Leber konnten dabei als Zellen gewonnen werden. Um für die Versuchsanordnung eine größere Menge funktionsfähiger Zellen zu erhalten, wurde dieses Verfahren für 4 - 5 Lebern wiederholt. Alle gewonnenen Zellen wurden vereinigt und durch ein Nylonnetz gefiltert, um noch restliche, größere Bindegewebssteile abzusondern. Anschließend wurde 1 min lang bei 750 U / min in einer Sorvall Zentrifuge (Rotor SS 34) zentrifugiert. Die Zellen setzten sich dabei ab. Nach Abkantieren des Überstandes wurden die Zellen erneut mit Medium aufgeschwemmt und wiederum zentrifugiert. Dieses Reinigungsverfahren wurde 3 mal wiederholt. Nach einer letzten Filtration durch das Nylonnetz wurde ein Aliquot Zellen mit Trypanblau gefärbt und unter dem Mikroskop kontrolliert. Zellen, die bereits defekt waren, färbten sich dabei an. Im Durchschnitt ließen sich damit 10% der Zellen markieren.

3. Inkubation der Leberzellen

Es wurden in Serien Doppelversuche unternommen, wobei die Zellen mit verschiedenen, aktiven Substanzen innerhalb eines Experimentansatzes im Erlenmeyer-Kolben, die mit Gummistopfen verschlossen waren, inkubiert wurden. Als Medium wurden 7 ml Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer mit 2,8 mM CaCl_2 für alle Inkubationen vorpipettiert und die jeweiligen radioaktiven Substanzen (Pyruvat-1 bzw. 2- ^{14}C , Lactat-1 bzw. 2- ^{14}C , Bicarbonat- ^{14}C , Octanoat-1- ^{14}C und Acetat-1- ^{14}C) mit den inaktiven Substraten (Lactat 21,4 mM, Pyruvat 19,4 mM, Octanoat 2,1 mM) untermischt. Jede Inkubation wurde anschließend mit der gleichen Menge Zellen entsprechend einem Proteingehalt von 136 mg gestartet. Für 30 Minuten wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C gehalten. Dabei wurden die Reaktionsgefäße über Kanülen mit einem Sauerstoff / CO_2 - Gemisch (95% / 5%) begast.

Zur Bestimmung der Produktionsraten wurden den Inkubationen Proben von 1 ml entnommen, mit 2 M Perchlorsäure gestoppt, zentrifugiert und wie in den Perfusionsexperimenten (siehe A,3) weiteranalysiert. Dabei wurden die Werte kurz vor Beendigung der Inkubationen mit den anfänglichen Produktionsraten der

Zellen gleich nach dem Start verglichen.

In den einzelnen Inkubationen wurden nach Ablauf von 30 min alle Reaktionen mit Perchlorsäure gestoppt und die zellulären Membranen wurden für 2 x 10 sec mit Ultraschall (Branson Sonifier, Modell LS-75, 20 kHz, Branson Instr. USA) aufgeschlossen. Die weitere Isolierung der einzelnen Metabolite aus den Zellen, sowie die Bestimmung der spez. Aktivitäten erfolgte wie bei der perfundierten Leber (A, 2. - 6.).

IV. E R G E B N I S S E

A) DIE PERFUNDIERTE LEBER

1. Metabolitbewegungen im Medium

a) Experimente mit Lactat:

Die Rattenleber von Hungertieren ließ günstige Stoffwechselbedingungen für die Gluconeogenese erwarten. Sie zeigte bei Perfusion mit einem Medium ohne Substrat nur eine geringe Glucoseausschüttung (Tab. I). Nach Zusatz von 5 mM Lactat als physiologischem Substrat kam es jedoch zu einem raschen Anstieg der Glucosebildung, die im Durchschnitt 44 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g}$ Leber erreichte. Gleichzeitig nahm im venösen Perfusat die Pyruvatkonzentration zu. Im Fließgleichgewicht deckten dabei Glucose- (83%) und Pyruvatproduktion (15%) in allen Versuchen nahezu die Lactataufnahme (100%), die im Mittel 107 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g}$ Leber erreichte. Nur 2% des Lactatverbrauchs waren oxydiert oder in andere Metabolite umgesetzt worden. Als weitere Metabolitveränderung nach Lactatgabe wurde eine sofort einsetzende, etwa 50% Abnahme der anfänglich hohen Ketonkörperbildung festgestellt, wobei die Acetoacetatproduktion stärker als die -Hydroxybutyratbildung sank. Damit stieg das Verhältnis von -Hydroxybutyrat zu Acetoacetat. Die höhere Stoffwechselaktivität der Leber nach Lactatzusatz spiegelte sich auch in einer Atmungssteigerung wieder, die im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch vor Substratgabe um durchschnittlich 49% zunahm. WILLIAMSON (1969) hatte aus der Atmungserhöhung nach Lactat und dem Energieverbrauch von 6 μmol ATP / 1 μmol gebildeter Glucose einen P / O Quotienten von 3 ermittelt. Dies würde einem Sauerstoffmehrerverbrauch von 1 $\mu\text{mol} / 1 \mu\text{mol}$ Glucose entsprechen. Der Mittelwert der O_2 -Aufnahme aus den Experimenten mit Lactat in Tab. III scheint im Vergleich zu den oben angestellten Betrachtungen nur geringfügig erhöht zu sein. In einzelnen Versuchen der Tab. I jedoch zeigt sich ein deutlicher, zusätzlicher Sauerstoffverbrauch. KREBS (1967a) konnte in früheren Experimenten mit Lactat ebenfalls eine Atmungs-

Tab. I Perfundierte Rattenleber:

Produktions (+) - und Verbrauchsdaten (-) einzelner Metabolite in den Versuchen La 1 - 6 vor und nach Gabe von Lactat als Substrat.

Tracer	$1-^{14}\text{C}$ -Lactat			$2-^{14}\text{C}$ -Lactat			$\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$			$1-^{14}\text{C}$ -Octanoat		
	Versuchsnummer	La 1	La 2	La 3	La 4	La 5	La 6					
Rattengewicht (g)		172	221	161	170	191	182					
Lebergewicht (g)		9,2	7,5	9,1	12	10,1	10,1					
(Trockengewicht x 4)												
Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)		33	33	33	33	33	33					
Durchfluß (ml/min)		28	29,5	42	42,5	26	26					
Lactatkonzentration (arteriell, mM)		4,36	4,41	4,30	4,98	4,15	3,55					
	$\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$											
	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Sauerstoffverbrauch (-)	98	146	131	133	138	196	84	151	87	123	103	137
Lactataufnahme (-)	-	73	-	135	-	196	-	161	-	43	-	37
Pyruvat (+)	-	10	-	7	-	29	-	40	-	5	-	8
Glucose (+)	4	28	8	60	9	77	3	54	-	21	-	27
Hydroxybutyrat (+)	10	5	15	11	26	11	3	3	-	11	10	14
Acetoacetat (+)	29	6	46	13	41	17	30	4	17	5	30	6
B-HOB/AcAc	0,3	0,8	0,3	0,9	0,6	0,6	0,1	0,7	-	2,2	0,3	2,3

Tab. II Perfundierte Rattenleber:

Berechnung des Umsatzes im Citrat-Cyklus aus der Atmung nach WILLIAMSON für die Experimente La 1 - 6
vor und nach Gabe von Lactat als Substrat.

Tracer	$1-^{14}\text{C}$ -Lactat		$2-^{14}\text{C}$ -Lactat		H^{14}CO_3		$1-^{14}\text{C}$ -Octanoat	
	La 1	La 2	La 3	La 4	La 5	La 6	La 5	La 6
Versuchsnummer	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Gesamtsauerstoffverbrauch ($\mu\text{A O} / \text{h} / \text{g Leber}$)	196	292	262	386	276	392	174	206
Mitochondrialer Anteil an der Atmung (88%, $\mu\text{A O} / \text{h} / \text{g Leber}$)	172	257	231	340	243	345	153	211
H-Äquivalente gebildet entsprechend der Produktion folgender Metabolite ($\mu\text{mol H}_2 / \text{h} / \text{g Leber}$)								
Acetoacetyl	100	22	162	45	143	60	60	105
Hydroxybutyrat	25	13	36	29	65	27	28	25
Pyruvat	-	10	-	7	-	26	-	5
Pyruvat oxyd.	-	31	-	45	-	53	-	-
Summe	125	76	198	126	208	176	60	130
Sauerstoffverbrauch entsprechend der Citrat-Cyklus-Rate ($\mu\text{A O} / \text{h} / \text{g Leber}$)	47	181	33	214	35	169	93	167
Acetyl-CoA-Verbrauch aus Fettsäuren im Citrat-Cyklus ($\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$)	8	31	6	37	6	29	16	29
Acetyl-CoA-Verbrauch entsprechend der Pyruvat-Oxydation ($\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$)	-	6	-	9	-	12	-	-
Citrat-Cyklus-Rate gesamt ($\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$)	8	37	6	46	6	41	16	29

Tab. III Perfundierte Rattenleber:

Produktions (+) - und Verbrauchsraten (-) einzelner Metabolite in den Versuchen La 1 - 6 vor und nach Gabe von Lactat als Substrat.

Versuchsbedingungen:

Rattengewicht	179 - 221	g
Lebergewicht (Trockengewicht x 4)	7,5 - 12	g
Durchfluß	26 - 42,5	ml/min
Lactatkonzentration	3,55 - 4,98	$\mu\text{mol/ml}$
Temperatur	33	$^{\circ}\text{C}$

$\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$

	vor		nach	
Versuchszahl n = 6	$\bar{x}$	s.e.m.	$\bar{x}$	s.e.m.
Sauerstoffaufnahme	106,8	3,7	157,6	5,0
Lactataufnahme	-	-	107,5	11,0
Pyruvat	-	-	16,4	2,5
Glucose	3,9	0,6	44,4	3,7
Hydroxybutyrat	10,5	1,5	9,1	0,7
Acetoacetat	32,0	1,7	8,5	0,8
β -HOB/AcAc	0,3	0,0	1,2	0,1
Umsatz im Citrat-Cyklus aus der Atmung nach WILLIAMSON	8,5	0,6	37,1	1,0
Citrat-Cyklus/Gluconeogenese (Trioseeinheit)	-	-	0,42	0,0

$\bar{x}$ = Mittelwert

s.e.m. = Mittlere Standardabweichung

steigerung nach Lactat beobachten, die über den eigentlichen Energieverbrauch der Gluconeogenese hinausging. BERRY (1973) schreibt eine wichtige Rolle an diesem Mehrbedarf nach Lactatgabe energieabhängigen Transportvorgängen an intrazellulären Membranen zu. Ebenso könnten größere Flüsse über "Futile Cycles", in denen energiereiche Phosphate verbraucht werden, als Erklärung dienen.

Zusammen mit der erhöhten Sauerstoffaufnahme stieg auch der Umsatz im Citrat-Cyklus, der sich aus den Produktionsraten der Metabolite im Medium und aus der Atmung nach WILLIAMSON (1969) in Tab. II berechnen ließ. Tab. III zeigt, daß sich der so ermittelte Umsatz des Citrat-Cyklus zur Triose-Einheit der Glucosebildung im Mittel wie 1 : 2 verhält. Setzt man die Flußgeschwindigkeit im Citrat-Cyklus vor Gabe von Lactat gleich 1, so steigt der Umsatz im Citrat-Cyklus nach Zusatz von 5 mM Lactat um das Vierfache.

b) Experimente mit Pyruvat:

Da Pyruvat als unmittelbares, intrazelluläres Substrat der Glucosebildung dient, wurde es in vier weiteren Versuchen in einer Konzentration von 5 mM dem Perfusionsmedium zugesetzt. Dabei kam es erneut zur Glucoseausschüttung der Hungerleber, die jedoch im Durchschnitt nur $27 \mu\text{mol} / \text{h} / \text{g}$ Leber erreichte und damit hinter der Produktion in den Experimenten mit Lactat zurückblieb. Möglicherweise war eine erschwerte Aufnahme von Pyruvat in die Leberzelle die Ursache dieser kleineren Gluconeogeneserate. Außerdem hatte wahrscheinlich das Defizit an Redoxäquivalenten im Cytosol in den Versuchen mit Pyruvat einen großen Einfluß auf die Glucoseproduktion, da für den Wasserstoff-Transport über mitochondriale Membranen unter gluconeogenetischen Bedingungen mit Pyruvat als Substrat heute Metabolit-Austauschsysteme gefordert werden müssen, deren regulatorische Funktion noch weitgehend ungeklärt ist.

Während der Perfusion zeigte die Pyruvat-Aufnahme trotz niedriger Glucoseproduktion zu Beginn einen steilen Anstieg, der im Zusammenhang mit einer erhöhten Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität gesehen werden könnte. Regelmäßig fiel der Pyruvatbedarf vor Erreichen des Fließgleichgewichts auf einen niedrigeren Wert ab. Parallel zur Glucosebildung setzte in allen Versuchen eine deutliche Lactatproduktion (55%) ein, die

Tab. IV

Produktions (+) - und Verbrauchsrate (-) einzelner Metabolite in den Versuchen
Py 1 - 4 vor und nach Gabe von Pyruvat als Substrat.

Tracer	$1-^{14}\text{C}$ -Pyruvat		$2-^{14}\text{C}$ -Pyruvat		$\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$	
Versuchsnummer	Py 1	Py 2	Py 3	Py 4		
Rattengewicht (g)	201	213	184	179		
Lebergewicht (g)	7,9	10,2	10	10		
(Trockengewicht x 4)						
Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	33	33	33	33		
Durchfluß (ml / min)	24,5	30,5	35	38		
Pyruvatkonzentration (arteriell, mM)	5,03	4,80	5,35	5,13		
$\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$						
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Sauerstoffverbrauch (-)	112	164	101	147	131	194
Pyruvataufnahme (-)	-	210	-	138	-	228
Lactat (+)	17	126	15	56	19	113
Glucose (+)	4	22	5	23	7	39
Hydroxybutyrat	9	8	8	6	2	1
Acetoacetat	29	19	17	7	29	15
β -HOB/AcAc	0,3	0,4	0,5	0,9	0,1	0,1

Tab. V Perfundierte Rattenleber:

Berechnung des Umsatzes im Citrat-Cyklus aus der Atmung nach WILLIAMSON für die Experimente mit Pyruvat als Substrat.

Tracer	$1-^{14}\text{C}$ -Pyruvat				$2-^{14}\text{C}$ -Pyruvat		$\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$
	Py 1		Py 2		Py 3		
Versuchsnummer	vor	nach	vor	nach	vor	nach	Py 4
Gesamtsauerstoffverbrauch ($\mu\text{A O} / \text{h} / \text{g Leber}$)	224	328	202	294	188	234	388
Mitochondrialer Anteil an der Atmung (88%, $\mu\text{A O} / \text{h} / \text{g Leber}$)	197	289	178	259	165	206	341
H-Äquivalente gebildet entsprechend der Produktion folgender Metabolite ($\mu\text{mol H}_2 / \text{h} / \text{g Leber}$)							
Acetoacetat	102	67	60	25	102	39	53
Hydroxybutyrat	23	20	20	15	10	8	3
Pyruvat oxidiert	-	200	-	180	-	-	185
Sauerstoffverbrauch entsprechend der Produktion folgender Metabolite ($\mu\text{A O} / \text{h} / \text{g Leber}$)							
Glucose	8	44	10	46	6	48	78
Lactat	17	126	15	56	2	92	113
Sauerstoffverbrauch entsprechend dem Umsatz im Citrat-Cyklus ($\mu\text{A O} / \text{h} / \text{g Leber}$)	97	172	123	141	61	299	291
Acetyl-CoA-Verbrauch aus Fettsäuren im Citrat-Cyklus ($\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$)	17	30	21	24	11	52	51
Acetyl-CoA-Verbrauch entsprechend der Pyruvat-Oxydation ($\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$)	-	40	-	36	-	-	37
Gesamter Umsatz im Citrat-Cyklus ($\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$)	17	70	21	60	11	52	88

Tab. VI Perfundierte Rattenleber:

Produktions (+) - und Verbrauchsdaten (-) einzelner Metabolite in den Versuchen Py 1 - 4 vor und nach Gabe von Pyruvat als Substrat.

Versuchsbedingungen:

Rattengewicht	179 - 213	g
Lebergewicht (Trockengewicht x 4)	7,9 - 10,2	g
Durchfluß	24,5 - 38	ml/min
Pyruvatkonzentration	4,80 - 5,35	$\mu\text{mol/ml}$
Temperatur	33	$^{\circ}\text{C}$

$\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$

	vor		nach	
Versuchszahl n = 4	$\bar{x}$	s.e.m.	$\bar{x}$	s.e.m.
Sauerstoffverbrauch	109,5	4,0	155,5	8,0
Pyruvataufnahme	-	-	178,2	11,9
Lactat	13,2	1,9	96,7	7,6
Glucose	4,7	0,4	27,0	2,0
Hydroxybutyrat	5,7	0,8	4,5	0,8
Acetoacetat	26,0	1,5	13,0	1,2
β -HOB/AcAc	0,3	0,1	0,4	0,1
Umsatz im Citrat-Cyklus aus der Atmung nach WILLIAMSON	19,0	1,7	67,5	3,8
Citrat-Cyklus/Gluconeogenese (Trioseeinheit)	2,0	0,0	1,25	0,1

$\bar{x}$ = Mittelwert

s.e.m. = Mittlere Standardabweichung

jedoch zusammen mit der Gluconeogeneserate (35%) die Pyruvataufnahme (100%) nicht decken konnte. Daher mußte auch im Fließgleichgewicht ein Teil des eingesetzten Pyruvats durch die Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA decarboxyliert worden sein, wobei dies bis zu 10% des aufgenommenen Pyruvats betragen konnte. Nach Angaben von WIELAND (1973) soll die Pyruvatdehydrogenase auch unter gluconeogenetischen Bedingungen in der Zelle durch die Pyruvatkonzentrationen aktiviert werden. Die Ketogenese ging wie in den Experimenten mit Lactat nach Substratgabe deutlich zurück.

Im Sauerstoffverbrauch zeigte die Leber während der Perfusion mit Pyruvat bei einer Aufnahmerate von $2 \mu\text{mol O}_2 / 1 \mu\text{mol}$ gebildeter Glucose einen deutlichen zusätzlichen Energieaufwand. Gleichzeitig stieg der Umsatz im Citrat-Cyklus und erreichte im Vergleich zur Glucoseproduktion weit höhere Werte als in den Versuchen mit Lactat. Dies ließe sich wiederum mit einem vermehrten Bedarf an Redoxäquivalenten im Cytosol erklären, der durch Transport von Wasserstoff aus den Mitochondrien gedeckt werden mußte. Tab. VI zeigt, daß sich das Verhältnis der Flußgeschwindigkeit im Citrat-Cyklus zur Triose-Einheit der Glucose einem Wert von 5 : 4 nähert und sich dadurch deutlich von den Ergebnissen in den Experimenten mit Lactat unterscheidet.

Da in all diesen Versuchen mit Lactat und Pyruvat die Harnstoffproduktion unter dem meßbaren Bereich lag, konnte für diese Versuchsbedingungen eine Glucosebildung aus Aminosäuren ausgeschlossen werden.

2. Spez. Aktivitäten der Metabolite

a) Experimente mit Lactat:

Durch zusätzliche Gabe von Tracern ins Perfusat mit unterschiedlichen Positionsmarkierungen der Kohlenstoffatome sollte der Weg der Glucosebildung an Hand der Markierungsmuster von Intermediaten in allen Versuchen verfolgt werden. Frühere Versuche mit inaktivem Pyruvat und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmitat an der perfundierten Rattenleber (MÜLLHOFER 1971) hatten gezeigt, daß durch Markierung des Fettsäure-Pools die Glucose im Vergleich zur C-4-5-Kohlenstoffeinheit des Citrats nahezu keine Aktivi-

Tab. VII Perfundierte Rattenleber:

Rel. spez. Aktivitäten einzelner Metabolite in den Versuchen mit inaktivem Lactat als Substrat und verschiedenen Tracern zur Markierung der Metabolit-Pools.

Spez. Ausgangsaktivitäten:

1- ¹⁴ C-Lactat	95 000 ipm / μmol
2- ¹⁴ C-Lactat	30 000 ipm / μmol
14C-Bicarbonat	315 000 ipm / μmol
1- ¹⁴ C-Octanoat (Durchschnittswert für die spez. Aktivität der C-4-5-Einheit des Citrats)	3 036 000 ipm / μmol

Tracer	1- ¹⁴ C-Lactat	2- ¹⁴ C-Lactat	H ¹⁴ CO ₃	1- ¹⁴ C-Octanoat
Lactat infundiert				
venös	1,00 ± 0,00	1,00	-	-
Gewebe	-	-	0,03 0,05	-
Glucose				
C-1-2-3	0,87 ± 0,07	1,42	0,96	0,04 ± 0,01
C-4	0,43 ± 0,04	0,69	0,50	0,02 ± 0,01
C-5	0,44 ± 0,05	0,05	0,48	0,02 ± 0,01
C-6	-	0,29 0,30	-	-
Malat	0,75 ± 0,06	0,83	0,83	0,07 ± 0,01
Citrat				
C-1-2-3-6	0,73 ± 0,06	0,91	1,34	1,03 ± 0,01
C-4-5	0,69 ± 0,04	0,91	1,33	0,03 ± 0,01
	-	-	-	1,00 ± 0,00

tät erhielt. In allen Experimenten mit Pyruvat konnte aber nicht ausgeschlossen werden, daß sich innerhalb der Zelle ein Substratgradient aufbaute. Eine schnelle Pyruvataufnahme von den äußeren Mitochondrien im Cytosol hätte die Konzentration für die weiter innen gelegenen bei einer nicht völlig freien Permeabilität von Pyruvat erniedrigt. Damit man daher mögliche, unterschiedliche metabolische Zustände der Mitochondrien vermied, die die Markierung in den Intermediat-Pools beeinflußt hätten, wurde in weiteren, analogen Experimenten inaktives Lactat als Substrat und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octanoat zur Markierung des Fettsäure-Pools eingesetzt. Man nahm dabei an, daß die Lactatdehydrogenase im Cytosol bei Lactatgabe eine gleichmäßige Pyruvatkonzentration bedingen könnte.

Die rel. spez. Aktivitäten der einzelnen Metabolite für diese Versuche sind in Tab. VII aufgeführt. Wie in den Experimenten mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmitat erhielt auch hier die Glucose nur einen geringen Anteil der Ausgangsmarkierung. Setzte man die Aktivität der C-4-5-Kohlenstoffeinheit des Citrats entsprechend dem mitochondrialen Acetyl-CoA-Pool gleich 1,0, so übertraf sie den Wert der Glucose um das 25-fache. Wegen Übereinstimmung dieser Versuche mit den Experimenten mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmitat wurde versucht, durch Gabe von Tracern für den gluconeogenetischen Substrat-Pool weitere Aufschlüsse über den Aufbauweg der Glucose zu finden.

In den Versuchen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ - bzw. $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat und ^{14}C -Bicarbonat als Tracern und inaktivem Lactat als Substrat wies die Glucose eine weitaus höhere rel. spez. Aktivität auf als in den Versuchen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octanoat. Unter der Annahme eines gemeinsamen Oxalacetat-Pools für Gluconeogenese und Citrat-Cyklus war in diesen Experimenten im Vergleich zur Ausgangsaktivität eine Verdünnung in der Markierung der Glucose zu erwarten, die der Flußgeschwindigkeit im Citrat-Cyklus entsprechen mußte. Wie Tab. VII zeigt, lag die Glucosemarkierung in den Versuchen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ - bzw. $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat deutlich (13% bzw. 0,58%) unter der eingesetzten Aktivität, während sie mit ^{14}C -Bicarbonat die Ausgangsmarkierung nahezu erreichte. Im Versuch mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat fanden sich außerdem im Unterschied zum entsprechenden Experiment mit Pyruvat gleiche Aktivitäten in Stellung 5 und 6 der Glucose. Malat, von dem man voraussetzte, daß es mit Oxalacetat und Fumarat im Gleichgewicht stand, enthielt in den Versuchen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ - bzw. $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat vergleichbare Markierungswerte, die mit der Glucose-

Tab. VIII Perfundierte Rattenleber:

Rel. spez. Aktivitäten einzelner Metabolite in den Versuchen mit inaktivem Pyruvat als Substrat und verschiedenen Tracern zur Markierung der Metabolit-Pools.

Spez. Ausgangsaktivitäten:

1- ¹⁴ C-Pyruvat	164 523 ipm / μmol
2- ¹⁴ C-Pyruvat	280 000 ipm / μmol
14C-Bicarbonat	344 000 ipm / μmol
1- ¹⁴ C-Octanoat (Spez. Aktivität der C-4-5-Einheit des Citrats)	2 500 000 ipm / μmol

Tracer	1- ¹⁴ C-Pyruvat	2- ¹⁴ C-Pyruvat	H ¹⁴ CO ₂	1- ¹⁴ C-Octanoat
Pyruvat infundiert	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-
Lactat				
venös	-	-	0,03	0,00
Gewebe	0,47 ± 0,02	0,50 ± 0,04	0,02	-
Glucose	0,69 ± 0,04	1,43 ± 0,00	0,69	0,07
C-4-5-6	0,32 ± 0,02	0,76 ± 0,00	0,33	0,04
C-4	-	0,07 ± 0,02	-	0,04
C-5	-	0,46 ± 0,06	-	-
C-6	-	0,23 ± 0,01	-	-
Malat	0,54 ± 0,03	0,87 ± 0,10	0,36	0,09
Citrat	0,53 ± 0,06	1,21 ± 0,00	1,00	1,05
C-1-2-3-6	0,53 ± 0,06	0,89 ± 0,10	0,98	0,05
C-4-5	-	0,32 ± 0,13	-	1,00
Phosphoglycerat	0,32 ± 0,02	0,63 ± 0,07	0,35	0,04
Phosphoenolpyruvat	0,32 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,34	0,04

aktivität jeweils in Übereinstimmung gebracht werden konnten. Citrat blieb in diesen Versuchen unauffällig, da es wie erwartet in den C-4-5-Atomen, die aus dem Acetyl-CoA-Pool stammen, keine Markierung trug und sich in der C-1-2-3-6-Einheit der Malataktivität annäherte. Im Gegensatz dazu unterschied sich in den Experimenten mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octanoat und ^{14}C -Bicarbonat die Markierung der C-1-2-3-6-Kohlenstoff-Einheit des Citrats deutlich von der Malataktivität. Demnach müßte man annehmen, daß sich in diesen Versuchen unbekannte intrazelluläre Wechselwirkungen zeigten, die in den Experimenten mit radioaktivem Lactat nicht nachweisbar waren.

b) Experimente mit Pyruvat:

Die Wiederholung eines Experiments mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat und inaktivem Pyruvat als Substrat zeigt Tab. VIII. Entgegen den Ergebnissen in früheren Experimenten (MÜLLHOFER 1972), die sich aus ungeklärten Gründen nicht mehr nachvollziehen ließen, enthielt die Stellung 5 der Glucose doppelt soviel Aktivität wie Stellung 6 und wies damit auf eine limitierte Äquilibration von Oxalacetat, Malat und Fumarat in der Malatdehydrogenase- und Fumarase-Reaktion hin. In den Versuchen mit Pyruvat und ^{14}C -Bicarbonat, sowie $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat ließ sich eine solche begrenzte Gleichgewichtseinstellung nicht direkt nachweisen. Mit Hilfe der unterschiedlichen Markierung in Stellung 5 und 6 der Glucose im Experiment mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat konnte jedoch die Aktivität in den Positionen 1 bzw. 4 von Malat auch für diese Versuche annähernd angegeben werden. Die aus der Gesamtktivität von Malat errechneten Werte ergaben für den jeweiligen Tracer ^{14}C -Bicarbonat bzw. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat rel. spez. Aktivitäten für Stellung 1 im Malat von 0,32 bzw. 0,36 und für Stellung 4 von 0,64 bzw. 0,18. Entsprechend ließ sich die Markierung in der Glucose mit 0,64 bzw. 0,72 berechnen, wobei sie mit der gemessenen Aktivität weitgehend übereinstimmte. Wegen der beschränkten Äquilibration von Oxalacetat, Malat und Fumarat lag erwartungsgemäß die rel. spez. Aktivität von Malat im Versuch mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat unter der gemessenen Glucosemarkierung, während sie umgekehrt im Experiment mit ^{14}C -Bicarbonat die Glucoseaktivität übertraf. Außerdem glich die C-1-2-3-6-Kohlenstoff-Einheit des Citrats in den Versuchen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ - bzw. $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat sowie ^{14}C -Bicarbonat wiederum der gemessenen Malataktivität. Wie die Aktivität in der C-4-5-Ein-

heit des Citrats im Versuch mit 2-¹⁴C-Pyruvat zeigte, mußte ein Teil des Pyruvats oxydiert worden sein.

In allen Experimenten mit Pyruvat als Substrat zeigte die Glucose aber im Vergleich zu den Versuchen mit Lactat insgesamt eine geringere ¹⁴C-Inkorporation, die aus unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen auf Grund der verschiedenen Substrate nicht erklärt werden konnte. Konstant wurde in den Versuchen mit radioaktivem Pyruvat eine rel. spez. Aktivität des Lactats gemessen, die im Vergleich zur eingesetzten Markierung des Pyruvats von 1,0 um etwa 50% im Extrakt erniedrigt war. Da Lactat mit Pyruvat in der Zelle im Gleichgewicht stand, mußte man annehmen, daß auch eine geringere Aktivität im intrazellulären Pyruvat-Pool vorlag, und die Markierungsunterschiede in der Glucose je nach Gabe von radioaktivem Lactat bzw. Pyruvat als Substrat verursachte. Diese Verdünnung im Pyruvat-Pool der Zelle konnte in diesen Versuchen nicht geklärt werden.

Zusammengefaßt hatten die Experimente an der perfundierten Leber damit immer eine Glucosemarkierung erbracht, die unter Ausnahme des Versuches mit ¹⁴C-Bicarbonat und inaktivem Lactat die Ausgangsaktivität unterschritt. Als Erklärung boten sich dafür die Wechselwirkung der Gluconeogenese mit dem Citrat-Cyklus, die ungeklärte Verdünnung der Aktivität im intrazellulären Pyruvat-Pool, sowie die begrenzte Äquilibrierung zwischen Oxalacetat Malat und Fumarat an. Welche Bedeutung diesen Parametern jeweils zugemessen werden mußte, ließ sich aus den Ergebnissen der Perfusionsversuche nicht ersehen. Gleichzeitig konnten die Markierungsergebnisse aus den Versuchen mit 1-¹⁴C-Octanoat sowie ¹⁴C-Bicarbonat offensichtlich nicht in das Stoffwechselmodell der Gluconeogenese eingeordnet werden.

Diese Diskrepanzen wurden zunächst im Zusammenhang mit den Schwierigkeiten gesehen, die die Standardisierung der metabolischen Ausgangsbedingungen in den einzelnen Lebern bereitete. Viele Faktoren, die auf den Stoffwechsel der Leber Einfluß nahmen, wie z. B. der hormonelle Zustand, waren unbekannt oder ließen sich nicht kontrollieren. Mit der Präparation von Leberzellen bot sich eine Methode an, die bessere Ausgangsbedingungen versprach.

B) DIE INKUBATIONEN MIT LEBERZELLEN

Unter den fünf Leberzell-Typen (ERICSON 1969) nehmen die eigentlichen Parenchymzellen nur einen Anteil von 60% bis 65% an der gesamten Population ein, obwohl sie zu etwa 85 - 95% am Frischgewicht der Leber beteiligt sind (WEIBEL 1968, LENTZ 1971). Als wichtigste Unterschiede zwischen den beiden Methoden der Leberperfusion und der Inkubation mit Leberzellen müssen folgende Versuchsbedingungen genannt werden:

Im offenen System der perfundierten Leber kann sich nach kurzer Zeit ein Fließgleichgewicht einstellen, wenn im arteriellen Einstrom die Konzentrationen konstant gehalten werden, wobei dann der Aufnahme in die Zelle aus dem Angebot an Substraten ein festes Maß an Abstrom von Produkten ins Medium entspricht. Die metabolischen Verhältnisse für die einzelnen Zellen ändern sich daher während des Versuchs nur geringfügig. In den Inkubationen mit Leberzellen kann wegen des geschlossenen Systems nur ein begrenztes Angebot an Substraten geschaffen werden. Je nach Stoffwechselaktivität der Einzelzellen wandelt sich das Milieu für die Gesamtheit. Ein Gleichgewichtszustand wie in der Perfusion wird dabei nicht erreicht. Es kann hier zur Anhäufung von Produkten kommen, die wiederum auf die metabolischen Verhältnisse in der Zelle Einfluß nehmen. Als großer Vorteil der Inkubationen mit Leberzellen gegenüber der Leberperfusion erweist sich jedoch die Möglichkeit, in einem Versuchsansatz mehrere Inkubationen einheitlicher Zellen mit verschiedenen Tracern unter identischen Bedingungen untersuchen zu können.

1. Metabolitveränderungen im Medium

a) Inkubationen mit Lactat:

Die Produktionsraten einzelner Metabolite wurden in den Inkubationen für den eingesetzten Proteingehalt der Zellen von jeweils 136 mg bei einem Eiweißgehalt von 180 mg / 1 g Leber bestimmt. Die Glucoseproduktion der Leberzellen erreichte mit inaktivem Lactat als Substrat durchschnittlich 50% der Ausschüttung in der perfundierten Leber. Im gleichen Ausmaß sank die Lactataufnahme, die wiederum annähernd der Glucose- und Pyruvatbildung entsprach. Deutlich zeigte sich in den Inkubationen mit

Tab. IX Leberzellen-Inkubation:

Produktions (+) - und Verbrauchsdaten (-) einzelner Metabolite in den Experimenten mit inaktivem Lactat als Substrat.

Inkubationsbedingungen: 7 ml Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer pH 7,4 ; CaCl_2 2,8 mM ;
Lactat 24,4 mM ; Octanoat 21,1 mM ; Atmosphäre O_2/CO_2 : 95/5 (v/v) ;
Leberzellenäquivalent von 136 mg Protein ; Temperatur 37 °C ;
Inkubationszeit 30 min .

Tracer	$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat	$2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat	^{14}C -Bicarbonat	$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octanoat	
Versuchsnummer	La I	La II	La III	La IV	$\bar{x}$ s.e.m.
$\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$					
Lactataufnahme	60,0	60,0	49,3	54,3	55,9 1,3
Pyruvat	5,4	5,2	4,5	4,1	4,8 0,2
Glucose	19,3	18,8	17,5	20,7	19,1 0,3
Hydroxybutyrat	20,6	22,3	17,3	25,4	21,4 0,9
Acetoacetat	7,1	7,1	10,5	8,5	8,3 0,4
β -HOB/AcAc	2,9	3,1	1,6	2,9	2,6 0,2

$\bar{x}$ = Mittelwert

s.e.m. = Mittlere Standardabweichung

Tab. X Leberzellen-Inkubation:

Produktions (+) - und Verbrauchsdaten (-) einzelner Metabolite in den Experimenten mit inaktivem Pyruvat als Substrat.

Inkubationsbedingungen: 8,3 ml Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer pH 7,4 ; CaCl_2 2,6 mM ;
 Pyruvat 19,5 mM ; Octanoat 21,8 mM ; Atmosphäre O_2/CO_2 : 95/5 (v/v) ;
 Leberzellenäquivalent von 124 mg Protein ; Temperatur 37 °C ;
 Inkubationszeit 30 min .

Tracer	1- ^{14}C -Pyruvat	2- ^{14}C -Pyruvat	^{14}C -Bicarbonat	1- ^{14}C -Octanoat	
Versuchsnummer	Py I	Py II	Py III	Py IV	$\bar{x}$ s.e.m.
$\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g Leber}$					
Pyruvataufnahme	104,5	111,6	142,7	157,3	124,0 4,7
Lactat	43,6	46,5	45,5	51,6	46,8 0,9
Glucose	16,4	17,4	17,1	16,7	16,2 0,1
Hydroxybutyrat	6,5	8,0	8,1	8,9	7,9 0,3
Acetoacetat	13,8	13,5	10,9	14,9	13,3 0,4
β -HOB/AcAc	0,5	0,6	0,7	0,6	0,6 0,1

$\bar{x}$ = Mittelwert

s.e.m. = Mittlere Standardabweichung

Lactat eine vermehrte Bildung von β -Hydroxybutyrat im Medium. Da außerdem Acetoacetat nach Stop der Inkubationen nur in geringen Mengen gemessen werden konnte, stieg das β -HOB/AcAc-Verhältnis im Vergleich zu den entsprechenden Perfusionsexperimenten steil an. Die Sauerstoffaufnahme wurde in allen Versuchsansätzen nicht gemessen. Damit konnte der Citrat-Cyklus aus der Atmung nicht abgeschätzt werden.

b) Inkubationen mit Pyruvat:

Auch in den Inkubationen mit inaktivem Pyruvat als Substrat lag die Glucosebildung unter den Produktionsraten in der Leberperfusion. Sie erreichte aber nahezu die Glucoseausschüttung in den Inkubationen mit Lactat. Gleichzeitig nahm auch die gemessene Lactatkonzentration im Medium ab. Ferner mußte ein Teil des eingesetzten Pyruvats decarboxyliert worden sein, da Glucose- und Lactatbildung die Substrataufnahme nur zu 65% deckten. Im Gegensatz zu den Inkubationen mit Lactat glichen hier die Verhältnisse von β -HOB/AcAc den entsprechenden Perfusionsexperimenten.

2. Spez. Aktivitäten der Metabolite

a) Inkubationen mit Lactat:

Wie in den Perfusionsexperimenten wurden in den Inkubationen der Leberzellen radioaktive Substanzen zur Markierung der Intermediat-Pools für Gluconeogenese und Citrat-Cyklus verwendet. Tab. XI beschreibt die Ergebnisse für alle Inkubationen mit Lactat als Substrat in einem Versuchsansatz. Vergleicht man sie mit den Resultaten der Experimente an der perfundierten Leber, so stimmen die Markierungsmuster in wesentlichen Punkten überein:

Die Glucosemarkierung war in allen Inkubationen verdünnt. Sie erreichte mit 1-¹⁴C-Lactat als Tracer eine rel spez. Aktivität von 0,57 und unterschied sich damit kaum noch von den Werten eines Perfusionsversuches mit Pyruvat. Erneut zeigte sich in der Inkubation mit 2-¹⁴C-Lactat gleiche Markierung in Stellung 5 und 6 der Glucose.

In allen Inkubationen mit radioaktivem Lactat war die Gesamtaktivität der Glucose aus der gemessenen Malatmarkierung zu erklären. Entsprechend ließ sich die Aktivität im Malat mit der Markierung in der C-1-2-3-6-Einheit des Citrats zur Deckung

Tab. XI Leberzellen-Inkubation:

Rel. spez. Aktivitäten einzelner Metabolite in den Experimenten mit inaktivem Lactat als Substrat und verschiedenen Tracern zur Markierung der Metabolit-Pools.

Spez. Ausgangsaktivitäten:

1- ¹⁴ C-Lactat	302 000 ipm / μ mol
2- ¹⁴ C-Lactat	252 000 ipm / μ mol
14C-Bicarbonat	646 000 ipm / μ mol
1- ¹⁴ C-Octanoat (Spez. Aktivität der C-4-5-Einheit aus Citrat)	312 000 ipm / μ mol

Tracer	1- ¹⁴ C-Lactat	2- ¹⁴ C-Lactat	¹⁴ C-Bicarbonat	1- ¹⁴ C-Octanoat
Lactat				
Start	1,00	1,00	-	-
Ende	1,01	0,98	0,01	0,02
Glucose	0,57	1,42	0,84	0,91
C-4-5-6	-	0,72	-	-
C-4	-	0,07	-	-
C-5	-	0,32	-	-
C-6	-	0,33	-	-
Malat	0,52	0,86	0,86	0,91
Citrat	0,60	1,02	1,09	1,85
C-1-2-3-6	0,60	0,96	1,09	0,85
C-4-5	0,00	0,06	0,00	1,00

Tab. XII Leberzellen-Inkubation:

Rel. spez. Aktivitäten einzelner Metabolite in den Experimenten mit inaktivem Pyruvat als Substrat und verschiedenen Tracern zur Markierung der Metabolit-Pools.

Spez. Ausgangsaktivitäten:

¹⁴ C-Pyruvat	589 000 ipm / μmol
2- ¹⁴ C-Pyruvat	567 000 ipm / μmol
¹⁴ C-Bicarbonat	689 000 ipm / μmol
1- ¹⁴ C-Octanoat (Spez. Aktivität der C-4-5-Einheit aus Citrat)	288 000 ipm / μmol

Tracer	1- ¹⁴ C-Pyruvat	2- ¹⁴ C-Pyruvat	¹⁴ C-Bicarbonat	1- ¹⁴ C-Octanoat
Pyruvat				
Start	1,00	1,00	-	-
Ende	0,84	0,96	0,11	0,19
Lactat	0,85	0,86	0,10	0,00
Glucose	0,62	1,56	0,81	1,09
C-4-5-6	-	0,79	-	-
C-4	-	0,06	-	-
C-5	-	0,58	-	-
C-6	-	0,15	-	-
Malat	0,49	1,09	0,64	0,98
Citrat	0,54	1,24	0,80	1,87
C-1-2-3-6	0,54	0,95	0,80	0,87
C-4-5	0,00	0,29	0,00	1,00

bringen. Nur in der Inkubation mit ^{14}C -Bicarbonat fiel wie in dem entsprechenden Perfusionsversuch eine Differenz zwischen der Aktivität im Malat und der Markierung in der C-1-2-3-6-Einheit des Citrats auf.

Im Unterschied zu den Perfusionsexperimenten mit Lactat führte aber die Inkubation mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octanoat zu einer hohen ^{14}C -Inkorporation in die Glucose und alle übrigen Metabolite relativ zur Markierung der C-4-5-Einheit des Citrats, die stellvertretend für die Aktivität im Acetyl-CoA-Pool gleich 1,0 gesetzt wurde. Diese Diskrepanz ließ sich mit den bekannten intrazellulären Wechselwirkungen nicht erklären.

b) Inkubationen mit Pyruvat:

In einem weiteren Versuchsansatz wurden alle Inkubationen mit inaktivem Pyruvat und den verschiedenen Tracern versetzt. Beim Vergleich mit den Perfusionsexperimenten fiel in den Inkubationen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octanoat wiederum die erhöhte Aktivitätsinkorporation in die Glucose und alle Intermediate auf. Die übrigen Markierungsmuster der Metabolite in den Inkubationen stimmten annähernd mit den Resultaten aus der Leberperfusion überein. Insbesondere war in der Inkubation mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat erneut eine assymmetrische Aktivitätsverteilung in Stellung 5 und 6 der Glucose festzustellen, die nur eine limitierte Äquilibrierung zwischen Oxalacetat, Malat und Fumarat erklären konnte. Die hohe Glucoseaktivität im Unterschied zur niedrigen Markierung im Malat war aber damit nicht zu begründen. Maximal hätte sich hier aus der Äquilibrierung der Aktivität im Oxalacetat durch die Malat-Dehydrogenase und die Fumarase eine ^{14}C -Inkorporation in die Glucose erwarten lassen, die der Aktivität im Malat glich.

V. DISKUSSION

In den Experimenten dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die komplexen, intrazellulären Wechselwirkungen der Gluconeogenese mit Hilfe von radioaktiven Substraten entsprechend unseren Kenntnissen erfassen lassen. EXTON hatte 1967 versucht, ein Modell für das Stoffwechselsystem der Gluconeogenese zu entwerfen, um damit seine Versuchsergebnisse mit Tracern an der Rattenleber zu überprüfen. Ähnliche Überlegungen wandte MÜLLHOFER (1972) in seinen Experimenten an der perfundierten Leber mit 2-¹⁴C-Pyruvat bzw. 1-¹⁴C-Palmitat an und entdeckte dabei Markierungsmuster in den Metaboliten der Zelle, die er mit bekannten Stoffwechselvorgängen nicht erklären konnte. Auch in dieser Arbeit werden die intrazellulären Wechselwirkungen der Gluconeogenese in drei vereinfachten Modellen beschrieben. Gleichzeitig wird überprüft, ob die Ergebnisse der Experimente damit erklärt werden können.

In den genannten Modellen A, B und C wurden die Metabolitflüsse berücksichtigt, die den ¹⁴C-Einbau in die Glucose beeinflussen konnten. Mit Hilfe der Gluconeogeneserate, der Flußgeschwindigkeit im Citrat-Cyklus und den Produktionsraten einzelner Metaboliten wurden damit theoretische Aktivitätswerte für die Glucose und alle übrigen Intermediate errechnet. Tab. XIII u. XIV zeigen die ermittelten rel. spez. Aktivitäten je nach Substrat für alle Perfusionsexperimente.

1. Markierungsmuster der Metabolite in den Experimenten an der perfundierten Leber bei Gabe von verschiedenen Tracern

Für die Perfusionsversuche mit Lactat wurde den Berechnungen das Stoffwechselmodell A zugrunde gelegt, weil hier Stellung 5 und 6 der Glucose im Experiment mit 2-¹⁴C-Lactat gleiche ¹⁴C-Inkorporation aufwiesen und damit eine rasche Äquilibrierung zwischen Oxalacetat, Malat und Fumarat beim Glucoseaufbau aus Lactat annehmen ließen (siehe Tab. XIII). Vergleicht man die theoretischen rel. spez. Aktivitäten der Glucose und aller übrigen Intermediate mit den analytischen Werten, so kann in den Experimenten mit 1- bzw. 2-¹⁴C-Lactat annähernde Übereinstimmung in den Markierungsmustern festgestellt werden. Die C-1-2-3-6-Einheit des Citrats und Malat tragen in diesen Versuchen erwartungs-

Tab. XIII Vergleich der rel. spez. Aktivitäten der Metabolite entsprechend dem Stoffwechsel-Modell A für die Gluconeogenese aus Lactat bei einem Verhältnis des Umsatzes im Citrat-Cyklus zur Gluconeogenese von 0,42 .

Tracer	1- ¹⁴ C-Lactat		2- ¹⁴ C-Lactat		14C-Bicarbonat		1- ¹⁴ C-Octanoat	
	Modell A . gemessen		Modell A . gemessen		Modell A . gemessen		Modell A . gemessen	
Lactat	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-
HCO ₃ ⁻	-	-	-	-	1,00	1,00	-	-
Malat	0,70	0,75	0,96	0,83	0,70	0,83	0,30	0,07
Citrat	-	-	-	-	-	-	-	-
C-4-5	-	-	0,05	0,00	-	-	1,00	1,00
C-1-2-3-6	0,70	0,69	0,96	0,91	0,70	1,33	0,30	0,03
Glucose	0,70	0,87	1,78	1,42	0,70	0,96	0,30	0,04
C-4	0,35	0,43	0,07	0,05	0,35	0,48	0,15	0,02
C-5	-	-	0,41	0,29	-	-	-	-
C-6	-	-	0,41	0,30	-	-	-	-

Tab. XIV Errechnete rel. spez. Aktivitäten für verschiedene Stoffwechsel-Modelle A, B und C in der Gluconeogenese bei einem Verhältnis des Umsatzes im Citrat-Cyklus zur Gluconeogenese von 1,25 .

Stoffwechselmodell	A	B		C		gemessen
		D = 0	D = 2	G ₂ = 0	G ₂ = 1	
Tracer: <u>1-¹⁴C-Pyruvat</u>						
Malat	0,45	0,45	0,44	0,00	0,26	0,54
Citrat, C4-5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
" C1-2-3-6	0,45	0,45	0,44	0,80	0,59	0,53
Glucose, C4	0,23	0,45	0,34	0,00	0,26	0,32
C5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tracer: <u>2-¹⁴C-Pyruvat</u>						
Malat	0,88	0,87	0,93	1,18	0,93	0,87
Citrat, C4-5	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,32
" C1-2-3-6	0,88	0,87	0,93	1,04	0,96	0,89
Glucose, C4	0,13	0,09	0,11	0,15	0,08	0,07
C5	0,31	0,62	0,47	0,44	0,54	0,46
C6	0,31	0,17	0,23	0,44	0,23	0,23
Tracer: <u>¹⁴C-Bicarbonat</u>						
Malat	0,45	0,45	0,44	0,00	0,00	0,96
Citrat, C4-5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
" C1-2-3-6	0,45	0,45	0,44	0,80	0,59	0,98
Glucose, C4	0,23	0,00	0,10	0,00	0,00	0,33
C5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tracer: <u>1-¹⁴C-Octanoat</u>						
Malat	0,54	0,54	0,54	1,00	0,64	0,09
Citrat, C4-5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
" C1-2-3-6	0,54	0,54	0,54	0,10	0,36	0,05
Glucose, C4	0,27	0,27	0,27	0,50	0,32	0,04
C5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

gemäß nahezu identische ^{14}C -Aktivität, und die Höhe der ^{14}C -Inkorporation läßt sich aus der rel. spez. Aktivität im Malat erklären. Eine Wechselwirkung zwischen Citrat-Cyklus und Gluconeogenese über den gemeinsamen Intermediat-Pool Oxalacetat scheint daher in diesen Versuchen stattgefunden zu haben.

Von diesen Ergebnissen weichen die Resultate aus den Perfusionenversuchen mit ^{14}C -Bicarbonat bzw. 1- ^{14}C -Octanoat und inaktivem Lactat deutlich ab. Die theoretischen Markierungsmuster der Metabolite für 1- ^{14}C -Lactat würden im Modell A auch bei Gabe von ^{14}C -Bicarbonat zutreffen. Im Experiment mit ^{14}C -Bicarbonat und Lactat aber steigt die Glucosemarkierung höher an, als die errechnete rel. spez. Aktivität und der gemessene ^{14}C -Einbau im Malat bei uneingeschränkter Äquilibrierung der Aktivität im Oxalacetat ergeben könnten. Außerdem fällt hier die gemessene Markierung der C-1-2-3-6-Einheit des Citrats auf, die die rel. spez. Aktivität des Malats im Versuch nahezu um 100% übertrifft und daher nicht in einem Citrat-Cyklus entstanden sein kann, dem diese beiden isolierten Metabolite gleichzeitig angehören.

Umgekehrte Aktivitätsmuster für die C-1-2-3-6-Einheit des Citrats und Malat wurden im Versuch mit 1- ^{14}C -Octanoat gemessen, obwohl auch hier übereinstimmende Markierungen in diesen Intermediaten erwartet wurden. Ungeklärt bleibt die Herkunft der insgesamt niedrigen ^{14}C -Inkorporation in die Glucose und alle übrigen Metabolite, wenn man als Bezugsgröße für die Aktivität im Acetyl-CoA-Pool die Markierung in der C-4-5-Einheit des Citrats gleich 1,0 setzt.

Während also die Resultate der Perfusionsexperimente mit 1- bzw. 2- ^{14}C -Lactat durchaus mit den bekannten Stoffwechselvorgängen vereinbar wären, zeigen sich in den Versuchen mit ^{14}C -Bicarbonat bzw. 1- ^{14}C -Octanoat und inaktivem Laktat Markierungsmuster in Glucose und Malat, die auf eine vollständige Kompartimentierung von Gluconeogenese und Citrat-Cyklus hindeuten. Eine solche Annahme wird aber offensichtlich durch die hohe Citratmarkierung widerlegt, die im Versuch mit ^{14}C -Bicarbonat auftritt. Bei einer Kompartimentierung der Intermediat-Pools für Gluconeogenese und Citrat-Cyklus konnte eine ^{14}C -Inkorporation in Citrat in diesem Ausmaß auf den bekannten Stoffwechselwegen nicht stattfinden.

Außerdem müßten unter solchen Bedingungen annähernd identische Markierungswerte in der C-4-5- und in der C-1-2-3-6-Einheit des Citrats gemessen werden. Möglicherweise handelt es sich daher in diesen Versuchen um eine Aktivität im Citrat, die als Durch-

schnittswert für mehrere, getrennte, intrazelluläre Pools mit unterschiedlichen Aufgaben ermittelt wurde.

Für die Perfusionsversuche mit Pyruvat als gluconeogenetischem Substrat scheinen zelluläre Stoffwechselvorgänge entsprechend dem Modell B zuzutreffen (Tab. XIV), da hier im Versuch mit 2-¹⁴C-Pyruvat als Tracer die Glucose in Stellung 5 und 6 eine große Markierungsdifferenz aufweist. Die ¹⁴C-Inkorporation in diese Positionen hängt vor allem von der Äquilibrierung zwischen Malat und Fumarat (D) relativ zum Fluß im gluconeogenetischen Weg (G) ab, der mit Pyruvat als Substrat die Äquilibrierung D weit zu überwiegen scheint. Eine Umverteilung der Aktivität im Oxalacetat aus der ursprünglich markierten Stellung 2 in die Stellung 3 entsprechend den Positionen 5 und 6 der Glucose würde ferner die Rezirkulation von Oxalacetat im Citrat-Cyklus mit sich bringen. Unter Extrembedingungen für D = 0 würde jedoch der Umsatz im Citrat-Cyklus nicht genügen, um die gemessene ¹⁴C-Markierung in der Position 6 der Glucose zu erreichen (gemessener Wert: C6 = 0,23; theoretischer Wert: C6 = 0,17). Es muß daher in den Experimenten mit Pyruvat als Substrat der Umsatz von Malat zu Fumarat berücksichtigt werden. Mit 2-¹⁴C-Pyruvat als Tracer könnte bei zunehmender Äquilibrierung relativ zur Gluconeogeneserate für D = 100 Stellung 5 und 6 der Glucose wie im Modell A annähernd gleiche Markierung annehmen (C5 bzw. C6 = 0,31). In den Versuchen mit 1-¹⁴C-Pyruvat würde die steigende Äquilibrierung zwischen Malat und Fumarat eine Abnahme der Aktivität in Position 4 der Glucose bewirken, während mit ¹⁴C-Bicarbonat als Tracer dadurch die ¹⁴C-Inkorporation in die Glucose zunähme. Für den Tracer 1-¹⁴C-Octanoat hat diese Äquilibrierung keinen Einfluß auf die ¹⁴C-Markierung der Glucose.

Zur Erhöhung der Glucosemarkierung im Experiment mit 2-¹⁴C-Pyruvat trägt auch wiederholt im Citrat-Cyklus rezirkulierendes Oxalacetat bei, so daß jede Position der Glucose über diesen Weg eine ¹⁴C-Inkorporation zu gleichen Anteilen erhält. Außerdem steigt in diesem Versuch durch markiertes Acetyl-CoA, das durch die Pyruvat-Dehydrogenase aus Pyruvat entsteht, die Aktivität in Stellung 4 der Glucose. Tatsächlich scheint sich jedoch im Experiment die Aktivität im Acetyl-CoA-Pool entsprechend der Markierung in der C-4-5-Einheit des Citrats (Tab. XIV C-4-5 = 0,32 gemessener Wert) nur geringfügig auf die Höhe der Glucosemarkierung in Stellung 4 (gemessene rel. spez. A. C4 = 0,7) auszuwirken, da nach theoretischen Schätzungen dieser

Aktivitätswert der Glucose bereits mit einer Markierung im Acetyl-CoA-Pool von 0,17 erzielt werden müßte. Annähernde Übereinstimmung zwischen analytischer und theoretischer Markierung der Glucose ergibt sich im Perfusionsversuch mit 2-¹⁴C-Pyruvat als Tracer bei einer Relation der Äquilibrierung D zur Gluconeogeneserate G von 2 im Modell B. Auch für 1-¹⁴C-Pyruvat als Tracer unterscheidet sich unter diesen Bedingungen die gemessene rel. spez. Aktivität der Glucose in Stellung 4 (0,32) nur geringfügig vom erwarteten Wert (0,34).

Im Gegensatz dazu zeigen sich beim entsprechenden Markierungsvergleich in den Versuchen mit ¹⁴C-Bicarbonat bzw. 1-¹⁴C-Octanoat und inaktivem Pyruvat große Differenzen. Während für ¹⁴C-Bicarbonat die gemessene Aktivität in Stellung 4 der Glucose (0,33) sogar den theoretischen Maximalwert für D = 100 (0,22) übersteigt, bleibt die ¹⁴C-Inkorporation in die gleiche Position der Glucose für 1-¹⁴C-Octanoat (0,04) weit unter dem erwarteten Minimalwert 0,27 zurück. Wie in den Perfusionsversuchen mit inaktivem Lactat deuten damit auch in den Versuchen mit inaktivem Pyruvat diese beiden Tracer ¹⁴C-Bicarbonat und 1-¹⁴C-Octanoat auf ungeklärte Wechselwirkungen zwischen Citrat-Cyklus und Gluconeogenese hin.

Auch in den Markierungsmustern der übrigen Intermediate zeigt sich in Tab. XIV für diese Tracer mit Pyruvat als Substrat wiederum eine Differenz zwischen erwarteten und gemessenen Aktivitätswerten. Mit ¹⁴C-Bicarbonat läßt sich im Modell B bei steigender Äquilibrierung D maximal für D = 100 eine rel. spez. Aktivität in Malat und die C-1-2-3-6-Einheit des Citrats von 0,45 erzielen, während sie im Versuch mehr als das Doppelte beträgt. Umgekehrt reicht die gemessene Markierung in Malat und in der C-1-2-3-6-Einheit des Citrats im Experiment mit 1-¹⁴C-Octanoat nie an die theoretisch möglichen rel. spez. Aktivitäten heran. Im Gegensatz dazu stimmen die errechneten Markierungsmuster dieser Intermediate mit den analytischen Daten der übrigen Versuche mit Lactat überein. In den Experimenten mit Pyruvat als Substrat würde aber neben den Flußraten im Citrat-Cyklus und der Gluconeogenese, neben der Äquilibrierung zwischen Malat und Fumarat auch die Umsetzungsgeschwindigkeit von Oxalacetat zu Malat einen Einfluß auf die Markierungsmuster der Glucose und aller Intermediate ausüben können. Malat gilt heute als Träger von Redoxäquivalenten und C-Atomen aus den Mitochondrien ins Cytosol, die dort zum Aufbau der Glucose aus Pyruvat benötigt werden. Im Modell C wird

diese Umsatzgeschwindigkeit G_2 der Malat-Dehydrogenase berücksichtigt. Für $G_2 = 0$ würde nur Malat, das über den Citrat-Cyklus entstanden ist, in die Glucose eingebaut werden. Umgekehrt könnte für $G_1 = 0$ auch direkt aus dem Oxalacetat entstandenes Malat ins Cytosol transportiert werden. Für $G_2 = 1,0$ relativ zur Gluconeogeneserate lassen sich wiederum im Versuch mit 1- bzw. 2- ^{14}C -Pyruvat den analytischen Markierungsmustern vergleichbare rel. spez. Aktivitäten errechnen. Insbesondere müßte für 2- ^{14}C -Pyruvat als Tracer auch im Modell C ein Markierungsunterschied zwischen Stellung 5 und 6 der Glucose auftreten. Die auffälligen Differenzen in den Experimenten mit den übrigen Tracern, ^{14}C -Bicarbonat und 1- ^{14}C -Octanoat bleiben jedoch bestehen.

Neben diesen genannten Problemen, die sich in den Perfusions-experimenten stellten, fiel in den Versuchen mit radioaktivem Pyruvat eine niedrige rel. spez. Aktivität von durchschnittlich 0,5 im Lactat des Extrakts auf. Da kein Anhalt für eine Limitierung der Lactat-Dehydrogenase bestand, mußte auch im intrazellulären Pyruvat-Pool mit einer vergleichbar geringen Markierung gerechnet werden, obwohl extrazellulär Pyruvat mit einer rel. spez. Aktivität von 1,0 angeboten worden war. Auch in früheren Experimenten mit 2- ^{14}C -Pyruvat (MÜLLHOFFER 1972) war offensichtlich eine solche Verdünnung ungeklärter Herkunft im intrazellulären Pyruvat-Pool beobachtet worden. Ein vermehrter Zustrom von Pyruvat als Abbauprodukt der Aminosäuren in diesen Pool galt wegen der äußerst niedrigen Harnstoffbildung in der Leber als unwahrscheinlich. Ein Rezirkulieren von Pyruvat über Malat und Phosphoenolpyruvat, wie es FRIEDMANN 1971 beschrieben hatte, ließ sich ebenfalls ausschließen, da in den Versuchen mit ^{14}C -Bicarbonat und 1- ^{14}C -Octanoat eine ^{14}C -Inkorporation in Lactat nicht stattfand. Außerdem widersprach solchen Überlegungen einer Rezirkulation von Pyruvat die rel. hohe Markierung in Malat und Phosphoenolpyruvat in den Versuchen mit 1 bzw. 2- ^{14}C -Pyruvat. Die möglichen Ursachen einer solchen Verdünnung im Pyruvat-Pool müssen daher weiter untersucht werden. In den Berechnungen der theoretisch erwarteten Markierungsmuster entsprechend den Modellen A, B und C konnte diese eventuell sehr niedrige Aktivität im Pyruvat-Pool der Zelle nicht berücksichtigt werden. Auf die rel. spez. Aktivitäten der Intermediate in den Versuchen mit ^{14}C -Bicarbonat und 1- ^{14}C -Octanoat und auf die damit verbundenen Fragen hätte sie keinen Einfluß ausgeübt. In den Experimenten mit radioakti-

vem Lactat bzw. Pyruvat aber hätte sich dadurch eine verminderte ^{14}C -Inkorporation in allen Metaboliten einstellen können.

Zusammengefaßt wurden also in den Ergebnissen der Perfusionsversuche deutliche Unterschiede je nach eingesetztem Tracer beobachtet. Die Markierungsmuster der Metabolite mit 1- und 2- ^{14}C -Pyruvat bzw. -Lactat als Tracer resultierten offensichtlich aus Stoffwechselvorgängen, wie sie in den Modellen A, B und C beschrieben wurden. Völlig entgegengesetzte Ergebnisse erbrachten die Versuche mit ^{14}C -Bicarbonat und 1- ^{14}C -Octanoat als Tracer. Sie ließen sich in keines dieser Stoffwechselsysteme einordnen. Einerseits glaubte man in diesen Experimenten Anhaltspunkte für eine räumliche Trennung zwischen Gluconeogenese und Citrat-Cyclus zu finden, mußte aber solche Vorstellungen wegen der gemessenen rel. spez. Aktivität im Citrat wieder ablehnen. In diesen Versuchen kann nach heutiger Auffassung der ^{14}C -Einbau in Citrat bei gleichzeitiger Markierung der Glucose nur über eine direkte Wechselwirkung zwischen Citrat-Cyclus und Gluconeogenese verstanden werden. Um daher solche widersprüchlichen Beobachtungen erklären zu können, müßte man einen Citrat-Pool fordern, der unmittelbar an der Glucosebildung beteiligt ist.

2. Markierungsmuster der Metabolite in den Inkubationen der Leberzellen bei Gabe von verschiedenen Tracern

Zum Vergleich wurden die Tracerstudien an der perfundierten Rattenleber mit isolierten Leberparenchymzellen wiederholt. Dabei sollte ausgeschlossen werden, daß sich neben den eigentlichen Parenchymzellen auch andere Leberzelltypen an den Metabolitveränderungen und an der ^{14}C -Inkorporation beteiligten. Den Leberparenchymzellen wurde wiederum Lactat bzw. Pyruvat als inaktives Substrat angeboten.

In der Inkubation mit 1- ^{14}C -Lactat als Tracer erreichten die Glucose, Malat und die C-1-2-3-6-Einheit des Citrats annähernd identische rel. spez. Aktivitäten (Tab. XI). Wie in dem vergleichbaren Perfusionsexperiment entsprechen diese Markierungsmuster den Vorstellungen über einen gemeinsamen Intermediat-Pool für Citrat-Cyclus und Gluconeogenese (siehe Modell A). Bei einer durchschnittlichen Gluconeogeneserate von $19 \text{ umol} / \text{h} / \text{g Leber}$ in Inkubationen der Leberzellen mit Lactat (Tab. IX) war daher im Modell A mit Hilfe der Glucosemarkierung von 0,57 eine Umsatzgeschwindigkeit im Citrat-Cyclus von $29 \text{ umol} / \text{h} / \text{g Leber}$ zu errechnen.

Diese Flußrate im Citrat-Cyklus konnte auch für den Versuch mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat bei Verwendung eines gleichen Leberzellenäquivalents wie in der Inkubation mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat vorausgesetzt werden. Demnach hätte man im Modell A folgende rel. spez. Aktivitäten für Glucose und die übrigen Intermediate erwarten dürfen: Glucose: 1,48 ($\text{C}_4 = 0,08$; C_5 bzw. $\text{C}_6 = 0,36$); Malat und die C-1-2-3-6 -Einheit des Citrats: 0,88. Wie Tab. XI zeigt, entsprechen diese theoretischen Markierungsmuster fast den analytischen Daten.

Auch für die Inkubation mit ^{14}C -Bicarbonat sollte ein Umsatz im Citrat-Cyklus von $29\text{ }\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g}$ Leber gelten. Unter diesen Bedingungen wäre in den Metaboliten eine ^{14}C -Inkorporation in Höhe der Aktivitäten im Experiment mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat zu erwarten gewesen. Tatsächlich aber liegen die ^{14}C -Markierungen für ^{14}C -Bicarbonat um etwa 50 - 60% über diesen Werten. Da die rel. spez. Aktivitäten von Malat und Glucose nur mit einem Viertel ($7\text{ }\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g}$ Leber) der geforderten Flußrate im Citrat-Cyklus vereinbar wären, scheint wiederum eine Wechselwirkung zwischen Citrat-Cyklus und Gluconeogenese nicht stattgefunden zu haben. Andererseits läßt sich die hohe Markierung der C-1-2-3-6 -Einheit des Citrats nur schwer ohne diesen Zusammenhang der beiden Stoffwechselwege erklären. Die gleiche Problematik hatte sich bereits in den Perfusionsexperimenten gestellt. Dort war versucht worden, die Markierungsverhältnisse im Citrat damit zu erklären, daß Citrat aus dem Extrakt dem Intermediat-Pool des Citrat-Cyklus nicht entsprach. Die Vorstellung, daß Citrat möglicherweise direkt am Glucoseaufbau beteiligt ist, scheinen auch die Inkubationen mit Leberzellen hier anzudeuten. Um gleichzeitig die ^{14}C -Inkorporation in Citrat erklären zu können, müßte neben der Bindung von CO_2 durch die Pyruvatcarboxylase eine weitere CO_2 -Fixationsreaktion gefordert werden.

Diese Schlüsse ließen sich auch aus den Ergebnissen der Inkubation mit Leberzellen für $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octanoat und inaktivem Lactat ziehen. Die hohe ^{14}C -Inkorporation in die Glucose würde hier einen Einbau von $1\text{ }\mu\text{mol}$ Acetyl-CoA / $1\text{ }\mu\text{mol}$ Glucose bedeuten. Da Enzyme aus dem Glyoxylat-Cyklus eine solche Bindung von C-Atomen aus Acetyl-CoA in der Glucose für Säugetiere nicht katalysieren, da sie dort nicht nachweisbar sind, könnte diese ^{14}C -Inkorporation nur über den Citrat-Cyklus stattfinden. Die gemessene rel. spez. Aktivität der Glucose erfordert jedoch einen weit höheren Fluß über den Citrat-Cyklus, als in der In-

kubation mit 1-¹⁴C-Octanoat und inaktivem Lactat angenommen werden darf. Für einen Umsatz im Citrat-Cyklus von 29 $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{g}$ Leber würde sich nur eine rel. spez. Aktivität der Glucose von 0,44 errechnen lassen. Auch Malat und die C-1-2-3-6-Einheit des Citrats, die die gleiche ¹⁴C-Inkorporation wie die Glucose erwarten ließen, übertrafen die theoretisch möglichen Werte um 100%.

Auffallend war jedoch die unterschiedliche Höhe des ¹⁴C-Einbaus in die Metabolite beim Vergleich der Ergebnisse aus der Inkubation mit Leberzellen und aus dem Leberperfusionsversuch für den gleichen Tracer 1-¹⁴C-Octanoat. Obwohl sich grundsätzliche Parallelen zu dem Experiment der Leberzellen ergaben, lag die ¹⁴C-Inkorporation der Metabolite mit Ausnahme der C-4-5-Einheit des Citrats als Bezugsgröße in den Perfusionsexperimenten weitaus niedriger. Möglicherweise handelte es sich hier um Auswirkungen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen im geschlossenen System der Inkubationen mit Leberzellen und im offenen System der Leberperfusion, wo unter den Bedingungen des Fließgleichgewichts eine eventuelle Konzentrierung von ¹⁴C-Aktivität in Metabolit-Pools vielleicht vermieden wird. Sollte aber diesen Diskrepanzen eine Kompartimentierung der Acetyl-CoA-Pools zugrunde liegen, wie FRITZ sie 1968 zu beobachten glaubte, so wäre die rel. spez. Aktivität dieses Metabolit-Pools als Bezugsgröße für die Markierung aller übrigen Intermediate nicht geeignet. Weitere Untersuchungen an Leberzellen sollten diese Frage klären.

Ähnlich wie in den Perfusionsexperimenten wurden bei Gabe von Pyruvat als Substrat in den Inkubationen mit 2-¹⁴C-Pyruvat als Tracer für Stellung 5 und 6 der Glucose unterschiedliche rel. spez. Aktivitäten bestimmt. Hier muß deshalb wieder auf eine begrenzte Äquilibrierung zwischen Malat und Fumarat entsprechend dem Modell B geschlossen werden. Mit diesem Ausmaß an Äquilibrierung der Aktivität zwischen Stellung 5 und 6 der Glucose kann in der Inkubation mit 1-¹⁴C-Pyruvat eine theoretische Markierung für Stellung 1 im Malat von 0,40 ermittelt werden. Die Glucose hätte daher in diesem Versuch eine rel. spez. Aktivität von 0,80 erreichen müssen, bleibt aber mit der Markierung von 0,62 noch deutlich unter diesem Wert. Sie übertrifft aber die Aktivität im Malat und in der C-1-2-3-6-Einheit des Citrats. Die Inkubation mit ¹⁴C-Bicarbonat und inaktivem Pyruvat bestätigte die Ergebnisse aller anderen Versuche mit diesem Tracer.

Bei einer Äquilibrierung zwischen Malat und Fumarat, wie sie in der Inkubation mit 2-¹⁴C-Pyruvat der Markierung in Stellung 5 und 6 der Glucose entsprach, hätte in diesem Experiment nur ein äußerst niedriger ¹⁴C-Einbau in die Glucose (0,20) über die Pyruvatcarboxylase erfolgen können. Gemessen wurde jedoch eine rel. spez. Aktivität der Glucose von 0,81, die außerdem mit der Markierung im Malat nicht in Einklang zu bringen ist (0,64). Diese Markierungsmuster lassen sich nur dadurch verstehen, daß neben der Bindung von CO₂ an Pyruvat eine zusätzliche Carboxylierungsreaktion wirksam wurde, die möglicherweise auch die Aktivität in der C-1-2-3-6-Einheit des Citrats bedingte.

Bei Gabe von 1-¹⁴C-Octanoat als Tracer zeigen sich in der Inkubation mit inaktivem Pyruvat ähnliche Markierungsmuster wie im entsprechenden Experiment mit Lactat. Eine rel. spez. Aktivität der Glucose von 1,09 würde in diesem Versuch nach Modell B einen Umsatz im Citrat-Cyklus erfordern, der sich mit der Glucoseogeneserate nahezu deckte.

Während in den Perfusionsexperimenten mit Pyruvat als Substrat insgesamt ein deutlicher Abfall der durchschnittlichen ¹⁴C-Inkorporation in die Metabolite im Vergleich zu den Versuchen mit Lactat festzustellen war, konnte dies in den Inkubationen der Leberzellen nicht beobachtet werden. Bei Gabe von Pyruvat als Substrat sollte wegen des vermehrten Bedarfs an Redoxäquivalenten beim Glucoseaufbau im Cytosol ein erhöhter Umsatz im Citrat-Cyklus mit gleichzeitig gesteigertem Verlust von ¹⁴C-Atomen über diesen Stoffwechselweg beobachtet werden. Der Einbau von ¹⁴C-Atomen in die Metabolite müßte daher in den Versuchen mit Pyruvat erniedrigt sein. Ob dieser Unterschied der Perfusionsexperimente zu den Inkubationen der Leberzellen allein auf Grund der verschiedenen Versuchsbedingungen zustande kam, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Schließlich soll auch in den Inkubationen der Leberzellen auf die Verdünnung im intrazellulären Pyruvat-Pool verwiesen werden. Im Lactat des Extrakts konnte hier in den Versuchen mit 1- bzw. 2-¹⁴C-Pyruvat etwa 3/4 der eingesetzten spez. Aktivität wiedergefunden werden. Damit war zu erwarten, daß auch im Pyruvat-Pool der Zelle die rel. spez. Aktivität höher lag als in den Perfusionsexperimenten, in denen die Markierung des Lactats durchschnittlich 50% der eingesetzten Aktivität im Pyruvat betrug. Die Herkunft dieser Verdünnung mußte aber weiterhin offen bleiben.

In allen Versuchen mit radioaktivem Lactat war eine erniedrigte Aktivität im Pyruvat-Pool der Gluconeogenese ebenfalls nicht ganz auszuschließen. Die Aktivitätswerte der Glucose lagen in diesen Versuchen immer unter der eingesetzten Markierung im Lactat. Große Schwierigkeiten bereitete es daher den Einfluß dieser Verdünnung im intrazellulären Pyruvat-Pool auf die Markierungsmuster der Metabolite abzuschätzen. Insbesondere konnte in allen Experimenten mit radioaktivem Pyruvat die Auswirkungen einer solch erniedrigten Aktivität im Pyruvat auf die ^{14}C -Inkorporation von den Wechselwirkungen des Citrat-Cyklus mit der Gluconeogenese nicht abgegrenzt werden. Würde man sie berücksichtigen und eine intrazelluläre Pyruvataktivität in Höhe der gemessenen Laktatmarkierung annehmen, so ließe sich in den Experimenten mit radioaktivem Pyruvat der Einfluß des Citrat-Cyklus auf die Markierungsmuster nicht mehr nachweisen. Unter solchen Bedingungen würden die Aktivität der Metabolite auch in diesen Versuchen eine völlige Trennung der beiden Stoffwechselwege Gluconeogenese und Citrat-Cyklus vermuten lassen.

Nur die Aktivität im Citrat würde damit noch in allen Experimenten der Perfusion und der Inkubation mit Leberzellen einer solchen Behauptung widersprechen, da sich hier auf Grund der Höhe der ^{14}C -Inkorporation ein Zusammenhang von Gluconeogenese und Citrat-Cyklus schwer leugnen läßt. Es wäre aber auch denkbar, daß dieses Citrat des Extrakts ein Intermediat des Glucoseaufbaus darstellt und daher vor allem in den Versuchen mit ^{14}C -Bicarbonat und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octanoat nicht in die Stoffwechselvorgänge des Citrat-Cyklus eingeordnet werden kann. D'ADAMO hatte 1965 in Versuchen mit radioaktivem Glutamat ein Modell der Gluconeogenese über einen C_4 -Körper beschrieben, wo durch reduktive Carboxylierung von α -Ketoglutarat mit einer NADPH-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase Citrat im Cytosol als Zwischenstufe durchlaufen werden sollte. Das Kohlenstoffgerüst hätte dabei in Form von α -Ketoglutarat aus den Mitochondrien ausgeschleust werden müssen. D'ADAMO schloß jedoch einen vermehrten Fluß über einen solchen Weg unter gluconeogenetischen Bedingungen wegen der niedrigen Aktivität der Citratlyase im Cytosol aus. Er sah die Aufgabe dieses Stoffwechselwegs in der Bildung von Acetyl-CoA für die Lipogenese im Cytosol. Trotzdem sollte wegen der widersprüchlichen Markierungsmuster dieser Arbeit an möglicherweise ähnliche Zellvorgänge beim Aufbau der Glucose gedacht werden.

Zusammengefaßt zeigt sich in den Experimenten der Perfusion und der Inkubation mit Leberzellen grundsätzliche Übereinstimmung

in vielen Beobachtungen. Besonders fielen die Markierungsmuster der Metabolite in den Experimenten mit ^{14}C -Bicarbonat und 1- ^{14}C -Octanoat auf, die vom bekannten Schema der Gluconeogenese abwichen. Es konnte in dieser Arbeit im Rahmen unserer heutigen Kenntnisse kein Stoffwechselmodell der Gluconeogenese angeboten werden, das für alle Tracer zuträfe. Man muß daher annehmen, daß sich in diesen Ergebnissen Hinweise auf noch unbekannte Stoffwechselmechanismen beim Aufbau der Glucose aus Lactat und Pyruvat zeigten. Ob auch eine Heterogenität der Leberzellen Ursache dieser Markierungsmuster sein könnte, sollten weitere Untersuchungen erbringen. Wichtig wäre auch die getrennte Isolierung cytosolischer und mitochondrialer Metabolite, die vielleicht eine Zuordnung der Intermediat-Pools zu den einzelnen Stoffwechselwegen ermöglichte. Außerdem könnten kinetische Studien helfen, die unterschiedliche Höhe der ^{14}C -Inkorporation in Experimenten der Leberperfusion und der Inkubation mit Leberzellen zu klären.

VI. LITERATURVERZICHTNIS

ASHMORE, J., WEBER, G.:

The Role of Hepatic Glucose-6-Phosphatase in the
Regulation of Carbohydrate Metabolism
Vitamins and Hormones 17, 91 (1959)

BALLARD, F.J., HARISON, R.W., RESHEF, L.:

Immunochemical Studies with Soluble and Mitochondrial
Pyruvate Carboxylase Activities from Rat Tissues
Biochem. J. 119, 735 (1970)

BERGMAYER, H.U.:

Methoden der enzymatischen Analyse
2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970)

BERRY, M.N., FRIEND, D.S.:

High Yield Preparations of Isolated Rat Liver Paren-
chymal Cells
The J. of Cell Biology 43, 506 (1969)

BERRY, M.N.:

Energy Demand of Endogenous Metabolism and Gluconeogene-
sis in Liver Cells from Normal and Hyperthyroid Rats
Regulation of Hepatic Metabolism
Alfred Benzon Symposium VI, ed. Lindquist, F. & Tygstrup,
N.S., Academic Press New York (1973)

BERRY, M.N., KUN, E., WERNER, H.V.:

Regulatory Role of Reducing Equivalent Transfer from
Substrate to Oxygen in the Hepatic Metabolism of Glycerol
and Sorbitol
Europ. J. of Biochem. 33, 407 (1973)

BORST, P.:

Korrelation zwischen Zellkompartimenten: Hydrogen Trans-
port and Transport of Metabolites
Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle
ed. by Karlson, P.: Springer Verlag, Berlin (1963)

BÜTTGER, J., WIELAND, O. BRDÍČKA, D., PETTE, D.:

Intracellular Location of Pyruvate-Carboxylase and
Phosphoenolpyruvate-Carboxykinase in Rat Liver
Europ. J. of Biochem. 8, 113 (1969)

BUCHANAN, J.M., HASTINGS, A.B., NESBELT, F.B.:

The Role of Carboxyl-Labeled Acetic, Propionic and Bu-
tyric Acids in Liver Glycogen Formation
J. of Biol. Chem. 150, 413 (1943)

CHANG, H.C., MARUYAMA, H., MÜLLER, R.S., LANE, M.D.:

The Enzymatic Carboxylation of Phosphoenolpyruvate:
Purification and Properties of Liver Mitochondria
Phosphoenolpyruvate-Carboxykinase
J. of Biol. Chem. 241, 2421 (1966)

CORI, C.F. and CORI, G.T.:

The Fate of Sugar in the Animal Body:
The Relation between Sugar Oxydation and Glycogen
Formation in Normal and Insulinized Rats during the
Absorption of Glucose
J. of Biol. Chem. 70, 557 (1926)

D'ADAMO, A.F., HAFT, D.E.:

An Alternative Pathway of α -Ketoglutarate Catabolism in
the Isolated Perfused Rat Liver
J. of Biol. Chem. 240, 613 (1965)

DOVE, D.:

The Role of Hepatic Glucose-6-Phosphatase in the Regu-
lation of Carbohydrate Metabolism
Bull. Soc. Chem. 31, 1242 (1949)

ERICSON, J.I.E.:

The Correlation of Structure with Function in the
Liver
The Biological Basis of Medicine (Bittar, E.E. & Bittar, N.
eds.) 5, 143 (1969) Academic Press, London and N.Y.

EXTON, J.H.:

Control of Gluconeogenesis in the Liver:
General Features of Gluconeogenesis in the Perfused

Livers of Rats

J. of Biol. Chem. 242, 2622 (1967)

FETCH, W.H., CHAIKOFF, J.L.:

Directions and Patterns of Adaptation Induced in Liver Enzymes of the Diabetic Rat by Feeding of Glucose and Fructose

Biochem. et Biophys. Acta 57, 588 (1962)

FRIEDMANN, B., GOODMAN, E.H., SAUNDERS, A.L., KOSTOS, V., WEINHOUSE, S.:

An Estimation of Pyruvic Recycling during Gluconeogenesis in the Perfused Rat Liver

Arch. Biochem. Biophys. Act. 143, 566 (1971)

FRITZ, J.B.:

Cellular Compartmentalisation and Control of Fatty Acid Metabolism

Proc. IV Meeting of FEBS Oslo 1967 (ed. F.c. Grain)
Academic Press New York, 39, (1968)

GOMORI, G.:

Hexosediphosphatase

J. of Biol. Chem. 148, 139 (1943)

HANSON, R.W., BALLARD, F.J.:

The Relative Significance of Acetate and Glucose as Precursors for Lipid Synthesis in Liver and Adipose Tissues from Ruminants

Biochem. J. 105, 529 (1967)

HASTINGS, A.B., VENNESLAND, J.B., SOLOMON, A.K., BUCHANAN, J.M.:

Glycogen Formation from Glucose in the Presence of Radioactive Carbon Dioxide

J. of Biol. Chem. 142, 379 (1942)

HASTINGS, A.B., TOPPER, Y.J.:

A Study of the Chemical Origins of Glycogen by use of ^{14}C -Labeled Carbon Dioxide, Acetate and Pyruvate

J. of Biol. Chem. 179, 1255 (1949)

HOBERMANN, H.D., D'ADAMO, A.F.:

- a) Coupling of Oxidation of Substrates to Reductive Biosynthesis: Studies with L- and D-Lactates
 - b) Coupling of Oxydation of Substrates to Reductive Biosynthesis: Studies with 2,2-D-Fumarate and 2,2-¹⁴C-Fumarate
 - c) Evidence for the Formation of Phosphoenolpyruvate in Liver by a Mechanism not Involving Equilibration with Fumarate
- J. of Biol. Chem. 235, a) 514, b) 519, c) 2185 (1960)

KLINGENBERG, M.:

Metabolite Transport in Mitochondria: An Example of Intracellular Membrane Function
Essays in Biochem. 6, 119 (Campbell P., Dickens F., eds.)
Academic Press London, N.Y. (1970)

KREBS, H.A.:

Considerations Concerning Pathways of Synthesis in Living Matter: Synthesis of Glycogen from Non-carbohydrate Precursors
Bull. John Hopkins Hosp. 95, 19 (1954)

KREBS, H.A., HEMS, R., WEIDEMANN, M.J., SPEAKE, R.N.:

The Fate of Isotopic Carbon in Kidney Cortex Slices
Synthesising Glucose from Lactate
Biochem. J. 101, 242 (1966)

KREBS, H.A.:

The Role of Gluconeogenesis from Various Precursors in the Perfused Rat
Biochem. J. 102, 942 (1967)

KREBS, H.A., VEECH, R.L.:

Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases
Springer Verlag Berlin, Sund, H. ed. S. 413 (1970)

KORNBERG, H.L.:

Anaplerotic Sequences and their Role in Metabolism
Essays of Biochem. 2, 1 (1966)

LAMARTINE, C.A., WEISS, G., MÜLLER-OHLY, B., SEUBERT, W.:

Intracellular Location of Pyruvate Carboxylase in Rat Liver
Europ. J. of Biochem. 45, 391 (1974)

LARDY, H.A., FOSTER, D.O., SHRAGO, E., RAY, P.D.:

Metabolic and Hormonal Regulation of Phosphoenolpyruvate
Synthesis

Advances in Enzyme Regulation 11, 39 (1964)

Pergamon Presss

LARDY, H.A., PAETKAU, V. WALTER, P.:

Paths of Carbon in Gluconeogenesis and Lipogenesis:
The Role of Mitochondria in Supplying Precursors of
Phosphoenolpyruvate

Proc. Nat. Ac. Sci. 53, 1410 (1965)

LEHNINGER, A.L.:

The Biosynthesis of Carbohydrates

"Biochemistry" Worth Publishers Inc., 485 (1971)

LENTZ, P.E., DI LUZIO, N.R.:

Biochemical Characterisation of Kupfer- and Parenchymal
Cells Isolated from Rat Liver

Exp. Cell Res. 67, 17 (1971)

MARCO, R., SEBASTIAN, S., SOLS, A.:

Location of the Enzymes of the Oxalacetate Metabolic
Cross Roads in Rat Liver Mitochondria

Biochem. Biophys. Res. Comm. 34, 725 (1969)

MC CLURE, W.R., LARDY, H.A., KNEIFEL, H.P.:

Rat Liver Pyruvate Carboxylase:

Preparation, Properties and Cation Spezifity

J. of Biol. Chem. 246, 3569 (1971)

MÜLLHOFER, G., KUNTZEN, O., HESSE, S., BUCHER, Th.:

Gluconeogenesis from L-Lactate-2-t-2-¹⁴C in Per-
fused Rat Liver

FEBS Lett. 4, 33 (1969)

MÜLLHOFER, G., KUNTZEN, O.:

Intracellular Compartmentalisation in the Perfused
Rat Liver: Examination of the Existence of a Uniform Mi-
tochondrial Oxalacetate Pool as an Intermediate of
Both Gluconeogenesis and Citric Acid Cycle
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 353, 1461 (1972)

NORDLIE, R.C., LARDY, H.A.:

Mammalian Liver Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
Activities
J. of Biol. Chem. 238, 2259 (1963)

NORDLIE, R.C.:

Glucose-6-phosphatase
The Enzymes 3. Aufl. Academic Press L., N.Y., IV, 543 (1972)

OCHOA, S., MEHLER, A.H., KORNBERG, A.:

Biosynthesis of Dicarboxylic Acids by Carbon Dioxide
Fixation: Isolation and Properties of an Enzyme from
Pigeon Liver Catalysing the Reversible Oxidative Decar-
boxylation of the Malic Acid
J. of Biol. Chem. 174, 979 (1948)

OCHOA, S. VEIGA SALLES, J.B., ORTEZ, D.J.:

Biosynthesis of Dicarboxylic Acids by Carbon Dioxide
Fixation: Enzymatic Synthesis of L-Malic-Acid by Re-
ductive Carboxylation of Pyruvic Acid
J. of Biol. Chem. 187, 863 (1950)

PONTREMOLI, S., HORECKER, B.L.:

Fructose-1,6-di-Phosphatase
The Enzymes 3. Aufl. Academic Press L., N.Y., IV, 611 (1972)

RESHEF, L., HANSON, R.W., BALLARD, F.J.:

Purification of Pyruvate Carboxylase from the Cytosol:
Fraction of Rat Liver and the Immunochemical Demonstration
of Differences between this Enzyme and the Mitochondrial
Pyruvate Carboxylase
J. of Biol. Chem. 244, 1994 (1969)

ROGNSTADT, R., KATZ, J.:

Gluconeogenesis in the Kidney Cortex: Quantitative

Estimation of Carbon Flow
J. of Biol. Chem. 247, 6047 (1972)

SCHOLZ, R.:

Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
Springer Verlag Heidelberg (Staib W., Scholz R. eds)
(1968)

SCRUTTON, M.C., UTTER, M.F.:

The Regulation of Glycolysis and Gluconeogenesis in
Animal Tissues
Ann. Rev. Biochem. 37, 249 (1968)

SCRUTTON, M.C., UTTER, M.F.:

Pyruvate Carboxylase: Interaction of the Enzyme with
Adenosin Triphosphate
J. of Biol. Chem. 240, 3714 (1965)

SCRUTTON, M.C., YOUNG, M.R.:

Pyruvate Carboxylase
The Enzymes 3. Aufl. Academic Press L., N.Y., VI, 1 (1972)

SEUBERT, W., HENNING, H.V., STUMPF, B., OHLY, B.:

On the Mechanism of Gluconeogenesis and its Regulation:
The Gluconeogenic Capacity and the Activities of Pyruvate
Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase of Rat
Kidney and Rat Liver after Cortison Treatment and Starvation
Biochem. Z. 344, 274 (1966)

SHRAGO, E., LARDY, H.A., NORDLIE, R.C., FOSTER, D.O.:

Metabolic and Hormonal Control of Phosphoenolpyruvate
Carboxykinase and Malic Enzyme in Rat Liver
J. of Biol. Chem. 238, 3188 (1963)

UTTER, M.F., KURAHASHI, K.:

Purification of Oxalacetic Carboxylase from Chicken Liver
J. of Biol. Chem. 207, 787 (1954)

UTTER, M.F.:

Equilibrium and Kinetic Studies of the Pyruvic Kinase
Reaktion
J. of Biol. Chem. 224, 2151 (1959)

UTTER, M.F., KEECH, D.B.:

Formation of Oxalacetate from Pyruvate and CO_2
J. of Biol. Chem. 235, PC 17 (1960)

UTTER, M.F., KEECH, D.B.:

Pyruvate Carboxylase: Properties
J. of Biol. Chem. 238, 2603 (1963)

UTTER, M.F.:

Pyruvate Carboxylase: Some Physical and Chemical Properties of the Highly Purified Enzyme
J. of Biol. Chem. 240, 1 (1965)

UTTER, M.F., KOLENBRANDER, H.M.:

Formation of Oxalacetate by CO_2 -Fixation on Phosphoenolpyruvate
The Enzymes 3. Aufl. Academic Press L., N.Y., VI, 117 (1972)

VENNESLAND, B., SOLOMON, A.K., BUCHANAN, J.M., HASTINGS, A.B.

KLEMPERER, F.W.:

The Participation of Carbon Dioxide in the Carbohydrate Cycle
J. of Biol. Chem. 140, 171 (1941)

VENEZIALE, C.M., GABRIELLI, F., LARDY, H.A.:

Gluconeogenesis from Pyruvate in Isolated Perfused Rat Liver
Biochemistry 9, 3960 (1970)

VENEZIALE, C.M.:

Gluconeogenesis in the Isolated Rat Liver: Studies with ^{14}C -Bicarbonate
Biochemistry 10, 2793 (1971)

WALTER, P., LARDY, H.A.:

Paths of Carbon in Gluconeogenesis and Lipogenesis
J. of Biol. Chem. 241, 2523 (1966)

WALTER, P., LARDY, H.A.:

The Synthesis of Precursors for Glucose from Pyruvate and Bicarbonate in Rat Kidney Mitochondria
J. of Biol. Chem. 242, 4594 (1967)

WEISFEL, E.R., STAUBLI, W., GNÄGI, H.R., HESS, F.A.:

Correlated Morphometric and Biochemical Studies on the
Liver Cell: Morphometric Model, Stereologic Methods and
Normal Morphometric Data for Rat Liver
J. Cell Biol. 42, 68 (1968)

WIELAND, O.H., PATZELL, C., LÖFFLER, G.:

Interconversion of Pyruvate-Dehydrogenase in the Isolated
Perfused Rat Liver
Europ. J. of Biochem. 33, 117 (1973)

WILLIAMSON, J.R.:

Effects of Fatty Acids, Glucagon and Anti-Insulinserum
on the Control of Gluconeogenesis, Ketogenesis in Rat
Liver
Advances in Enzyme Regulation 5, 229 (1967)

WILLIAMSON, J.R.:

Control Mechanism of Gluconeogenesis and Ketogenesis:
Interactions between Fatty Acid Oxydation and the Citric-
Acid Cycle in the Perfused Rat Liver
J. of Biol. Chem. 244, 4617 (1969)

WINHURST, J.M., MANCHESTER, K.L.:

Induction and Suppression of the Key Enzymes of Gly-
colysis and Gluconeogenesis in Isolated Perfused Rat Liver
in Response to Glucose, Fructose and Lactate
Biochem. J. 134, 143 (1973)

WOOD, H.G., WERKMAN, C.H.:

The Utilisation of CO_2 in the Dissimilisation of Glycogen
by the Propionic Bacterium
Biochem. J. 30, 48 (1936)

YOUNG, J.W., SHRAGO, E.:

Metabolic Control of Enzymes Involved in Lipogenesis
and Gluconeogenesis
Biochem. J. 3, 1687 (1964)

ZUSAMMENFASSUNG:

Allgemein gilt heute, daß die zellulären Vorgänge beim Aufbau der Glucose aus Lactat und Pyruvat hinreichend bekannt sind. Trotzdem berichteten immer wieder Autoren, daß ihre Ergebnisse aus Experimenten mit radioaktiv markierten Substanzen dem geforderten Stoffwechselgeschehen der Gluconeogenese nicht entsprächen. Es wurde daher in dieser Arbeit versucht, zur Lösung dieser Fragen mit Experimenten an der perfundierten Leber und an isolierten Leberzellen der Ratte beizutragen.

Dazu wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen mit Lactat und Pyruvat als Substrat die Metaboliten der Zelle durch Gabe von 1- und 2- ^{14}C -Lactat bzw. -Pyruvat, ^{14}C -Bicarbonat und 1- ^{14}C -Octanoat markiert. Die beobachteten Aktivitätsmuster von Glucose, Malat, Citrat, Lactat, Phosphoenolpyruvat und Phosphoglycerat wurden anschließend mit theoretischen Werten verglichen, die sich nach heutigen Kenntnissen vom Aufbau der Glucose erwarten ließen. Diese wurden aus Stoffwechselmodellen errechnet, die die bekannten intrazellulären Wechselwirkungen der Gluconeogenese erfaßten.

Mit dieser Methode ließen sich deutliche Differenzen zwischen analysierten Markierungsmustern und theoretischen Aktivitätswerten der Metabolite aufdecken. Dabei zeigten die Experimente an der perfundierten Leber und an isolierten Leberzellen ähnliches Stoffwechselverhalten und erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Die auffallenden Markierungsunterschiede der Experimente mit ^{14}C -Bicarbonat und 1- ^{14}C -Octanoat zu den Versuchen mit radioaktivem Lactat bzw. Pyruvat führten zu folgenden Behauptungen:

1. Das gereinigte Citrat der Zelle stammt aus mehreren getrennten Intermediat-Pools. Einer dieser Pools scheint direkt am Glucoseaufbau beteiligt zu sein.
2. Die Zusammenhänge der Gluconeogenese mit dem Citrat-Cyclus werden durch alleinige Beschreibung eines gemeinsamen Oxalacetat-Pools nicht ausreichend erfaßt. Es existieren intrazelluläre Wechselwirkungen der Gluconeogenese, die sich nicht in das bekannte Stoffwechselmodell des Glucoseaufbaus einordnen lassen. Grundsätzlich bewiesen diese Experimente mit markierten Substraten, daß eine Konzentrationsbestimmung der Metabolite allein

nicht genügt, um zelluläre Vorgänge aufzeigen zu können, da Kompartimentierungen von Intermediaten dadurch nicht erkannt und berücksichtigt werden. Obwohl sich mit markierten Substanzen Hinweise für verschiedene Pools eines einzigen Metaboliten beobachten lassen, reicht auch diese Methode nicht aus, um eine genaue Zuordnung der einzelnen Pools zum entsprechenden Stoffwechselweg zu erlauben. Dazu muß in weiteren Untersuchungen eine Auftrennung dieser Pools unternommen werden.

VIII. D A N K S A G U N G

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. G. Müllhofer bin ich
für die Anregung und Betreuung des Themas zu großem
Dank verpflichtet.

IX. L E B E N S L A U F

Am 31. August 1949 wurde ich in Wiesau als Tochter des
Rektors Johann Gleißner und seiner Ehefrau Marianne,
geb. Kastner, geboren.

1955 trat ich in die Volksschule Wiesau ein. Anschließend
besuchte ich ab 1960 das Neusprachliche Gymnasium in
Marktredwitz, wo ich im Juni 1969 das Abitur ablegte.

Das Studium der Medizin begann ich an der Universität
München im Wintersemester 1969/70. Zwei Semester meines
klinischen Studiums konnte ich mit Hilfe eines Ausland-
stipendiums der Studienstiftung des deutschen Volkes an
der Medical School Newcastle in England verbringen. Am
13. Juni 1975 beendete ich die Ärztliche Prüfung an der
Universität München. Nach meiner Medizinalassistentenzeit
am Katharinenhospital Stuttgart und an der Medizinischen
Universitätsklinik Tübingen erhielt ich am 1. März 1977
meine Approbation als Ärztin.

Seit dem 12. Juni 1976 bin ich mit dem Arzt Gerhard Müller
verheiratet.

